

**ANZAHL CD34/CD133-POSITIVER ZELLEN  
IM PERIPHEREN BLUT VON PATIENTEN  
MIT HERZINSUFFIZIENZ  
UNTERSCHIEDLICHER SCHWEREGRADE**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Franziska Lorenz**

**geboren am 16. Juli 1983 in Sondershausen**

**Gutachter:**

- 1. Prof. Dr. med. Dagmar Barz, Direktorin des Instituts für Transfusionsmedizin,  
Friedrich-Schiller-Universität Jena**
- 2. Prof. Dr. med. Gregor Bein, Direktor des Instituts für Klinische Immunologie und  
Transfusionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen**
- 3. Priv.-Doz. Dr. med. Herbert-G. Sayer, Oberarzt Klinik für Innere Medizin II  
Onkologie-Hämatologie-Gastroenterologie-Hepatologie-Infektiologie,  
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 07. Oktober 2008**

## Abkürzungsverzeichnis

BASO	basophile Granulozyten
Bax	Bcl-2 assoziiertes X-Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BD	Becton Dickinson
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
CRP	capsel-reaktives Protein der Akute-Phase-Reaktion
CXCR-4	CXC Chemokin Rezeptor-4 (Synonym: Fusin)
DB	Differentialblutbild
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylene diamine tetraacetic acid)
EF	Ejektionsfraktion
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EOS	eosinophile Granulozyten
EPC	endotheliale Progenitorzellen
EPO	Erythropoetin
Fab	antigenbindendes Fragment von Antikörpern
Fc	crystallines Fragment von Antikörpern
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	forward scatter
FSU	Friedrich-Schiller-Universität
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HGF	hepatocyte growth factor
HLA	human leukocyte antigen
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1 (Synonym: CD54)

## Abkürzungsverzeichnis

ID	Identifikation
IL	Interleukin
INF	Interferon
J	Jahre
JAK2	Janus-Kinase-2
KHK	Koronare Herzkrankheit
L	Liter
LDL	low density lipoprotein
LEU	Leukozyten
LL	lower left
LR	lower right
LYM	Lymphozyten
m	Meter
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
min	Minute
ml	Milliliter
MNC	mononukleäre Zellen
MONO	Monozyten
NEU	neutrophile Granulozyten
NO	Stickstoffmonoxid (nitric oxide)
NYHA	New York Heart Association
p	statistische Überschreitungswahrscheinlichkeit von $\alpha$ (so genannter p-Wert)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCI	percutaneous coronary intervention
PECAM-1	platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (Synonym: CD31)
PE	Phycoerythrin
QS	Quadrantenstatistik
r	Korrelationskoeffizient
RG	Reaktionsgefäß
RLE	relative Lichteinheiten
S.I.	Internationales System der Einheiten (système international d'unités)
SDF-1	stromal cell-derived factor-1 (Synonym: CXC Chemokin Ligand-12)
SSC	sideward scatter
STAT3	signal transducer and activation of transcription-3

## Abkürzungsverzeichnis

TAL-1/SCL	T-cell acute lymphocytic leukaemia-1/ stem cell leukaemia
u.a.	unter anderem/-n
UL	upper left
UR	upper right
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1 (Synonym: CD106)
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR-2	vascular endothelial growth factor receptor-2 (Synonyme: Flk-1 (fetal liver kinase-1), KDR (kinase insert domain receptor))
vWF	von Willebrand Faktor
z.B.	zum Beispiel

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
2.1 Grundlagen der Herzinsuffizienz .....	3
2.1.1 Definition .....	3
2.1.2 Epidemiologie .....	3
2.1.3 Formen der Herzinsuffizienz.....	4
2.1.4 Ursachen: Ätiologie und Risikofaktoren.....	5
2.1.5 Stadieneinteilung: NYHA-Klassifikation .....	6
2.2 B-Typ natriuretisches Peptid (BNP) .....	7
2.3 Endotheliale Progenitorzellen und primitive CD34+/CD133+ Stammzellen.....	8
2.3.1 Endotheliale Progenitorzellen (EPC) .....	8
2.3.2 Phänotypen von Endothelzellen und zirkulierenden EPC.....	8
2.3.3 Primitive zirkulierende CD34+/CD133+ Stammzellen .....	10
2.3.4 Oberflächenantigene der primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen .....	10
2.3.4.1 CD34 .....	10
2.3.4.2 CD133 .....	11
2.3.5 Abstammung und Differenzierungswege der CD34+/CD133+ Stammzellen .....	12
2.3.6 Einflussfaktoren auf die Anzahl der zirkulierenden CD34+ Stammzellen .....	15
<b>3. Fragestellung und Zielsetzung .....</b>	<b>16</b>

<b>4. Patientenkollektiv und Materialien .....</b>	<b>17</b>
4.1 Patientenkollektiv .....	17
4.2 Materialien .....	18
4.2.1 Chemikalien .....	18
4.2.2 Verbrauchsmaterialien .....	18
4.2.3 Antikörper .....	19
4.2.4 Geräte .....	20
4.2.5 Software .....	20
<b>5. Methoden.....</b>	<b>21</b>
5.1 Herstellung von Lösungen .....	21
5.1.1 Phosphate Buffered Saline (PBS) .....	21
5.1.2 Lyselösung .....	21
5.2 Gewinnung der Blutproben .....	21
5.3 Verdünnung der Antikörper .....	22
5.3.1 Anti-CD133 und Anti-Maus-IgG <sub>2b</sub> , $\kappa$ .....	22
5.3.2 Anti-CD34 und Anti-Maus-IgG <sub>1</sub> .....	23
5.4 Erstellung der Differentialblutbilder .....	24
5.4.1 Blutanalysegerät Cell-Dyn <sup>®</sup> 4000 .....	24
5.4.2 Funktions- und Messprinzip des Cell-Dyn <sup>®</sup> 4000.....	24
5.4.3 Einstellungen am Cell-Dyn <sup>®</sup> 4000 .....	26
5.4.4 Arbeitsschritte am Cell-Dyn <sup>®</sup> 4000.....	26
5.5 Durchflusszytometrie .....	27
5.5.1 Durchflusszytometer FACSCalibur <sup>™</sup> .....	27
5.5.2 Funktions- und Messprinzip des FACSCalibur <sup>™</sup> .....	27
5.5.3 Einstellungen am FACSCalibur <sup>™</sup> .....	30

5.6 Arbeitsschritte zur Probenpräparation.....	31
5.6.1 Vorbereitungen.....	31
5.6.2 Lysierung der Erythrozyten.....	31
5.6.3 Blockierung der Fc-Rezeptoren .....	32
5.6.3.1 Immunologische Grundlagen .....	32
5.6.3.2 Absättigung der Fc-Rezeptoren mit Fc-Blocking Reagenz.....	32
5.6.4 Anfärbung der Zellen mit Anti-CD34 und Anti-CD133 .....	33
5.6.5 Durchführung der Isotypkontrolle.....	33
5.6.6 Durchführung der Negativkontrolle .....	34
5.7 Arbeitsschritte zur durchflusszytometrischen Probenanalyse.....	34
5.8 Berechnung der Anzahl der im Blut zirkulierenden Zellen .....	36
5.8.1 Anzahl der Lymphozyten.....	36
5.8.2 Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen.....	36
5.8.3 Berechnung der Anzahl der CD34+/CD133+ Stammzellen an einem Beispiel.....	37
5.8.4 Anzahl der zirkulierenden CD34+, CD34+/CD133–, CD133+ und CD133+/CD34– Zellen .....	39
5.8.5 Berechnung der Anzahl der CD34+, CD34+/CD133–, CD133+ und CD133+/CD34– Zellen an einem Beispiel.....	39
5.9 Bestimmung der BNP-Konzentration .....	40
5.10 Erfassung klinischer Parameter .....	40
5.11 Statistische Methoden .....	41
5.11.1 Analyse des Verteilungstyps .....	41
5.11.2 Verteilungsunabhängige Tests .....	41
5.11.2.1 Kruskal-Wallis-Test .....	41
5.11.2.2 Mann-Whitney-Test und $\alpha$ -Adjustierung.....	41
5.11.3 Verteilungsabhängiger T-Test.....	42
5.11.4 Analyse der prozentualen Anteile von Stammzellen .....	42
5.11.5 Analyse der Korrelationen (statistische Zusammenhänge).....	43



<b>6. Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
6.1 Zusammensetzung des Patientenkollektivs .....	44
6.2 Auswertung der durchflusszytometrischen Probenanalyse .....	46
6.3 Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen .....	49
6.3.1 Primitive CD34+/CD133+ Stammzellen: NYHA-Gruppen und insgesamt .....	49
6.3.2 Primitive CD34+/CD133+ Stammzellen: leichte und schwere Herzschwäche .....	51
6.4 Anzahl der zirkulierenden CD34+ Stammzellen .....	53
6.4.1 Zirkulierende CD34+ Zellen: NYHA-Gruppen und insgesamt .....	53
6.4.2 Zirkulierende CD34+ Zellen: leichte und schwere Herzschwäche .....	54
6.5 Anzahl der zirkulierenden CD34+/CD133– Zellen .....	56
6.5.1 Zirkulierende CD34+/CD133– Zellen: NYHA-Gruppen und insgesamt .....	56
6.5.2 Zirkulierende CD34+/CD133– Zellen: leichte und schwere Herzschwäche .....	57
6.6 Anzahl der zirkulierenden CD133+ Zellen .....	59
6.7 Anzahl der zirkulierenden CD133+/CD34–Zellen .....	61
6.8 Zirkulierende CD34+ Stammzellen: prozentuale Anteile der CD34+/CD133+ und der CD34+/CD133– Stammzellen .....	63
6.9 Korrelationen der primitiven Stammzellen .....	64
6.9.1 Korrelationen der Stammzellzahlen mit den NYHA-Gruppen der Herzschwäche.....	64
6.9.2 Korrelation der CD34+/CD133+ Stammzellen mit den CD34+ Stammzellen.....	65
6.10 Leukozyten und Lymphozyten im Blut von Patienten mit Herzinsuffizienz.....	66
6.10.1 Anzahl der Leukozyten und Lymphozyten: NYHA-Gruppen und insgesamt .....	66
6.10.2 Leukozyten und Lymphozyten: prozentuale Anteile der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen .....	68
6.10.3 Korrelationen der Leukozyten und Lymphozyten mit den Stammzellzahlen.....	69

## Inhaltsverzeichnis

6.11 BNP-Konzentrationen im Blut von Patienten mit Herzinsuffizienz .....	70
6.11.1 BNP-Konzentrationen: NYHA-Gruppen und insgesamt .....	70
6.11.2 Korrelationen der BNP-Konzentrationen mit den Stammzellenzahlen und mit den NYHA-Gruppen der Herzschwäche .....	72
6.12 Nachuntersuchung eines kardial dekompensierten Patienten in NYHA IV nach klinischer Verbesserung seiner Herzleistung zu NYHA II .....	74
<b>7. Diskussion .....</b>	<b>76</b>
<b>8. Schlussfolgerungen.....</b>	<b>96</b>
<b>9. Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>10. Anhang .....</b>	<b>113</b>

## 1. Zusammenfassung

Hintergrund: Die CD34+/CD133+ Stammzellen sind primitive Vorläufer von Zellen der Hämatopoese und Neovaskulogenese. Eine verminderte Anzahl im peripheren Blut soll mit dem Auftreten von ischämischen Erkrankungen assoziiert sein. Die Erhöhung der Anzahl von CD34+ Zellen nach einem akuten Myokardinfarkt führt zur Verbesserung der Herzfunktion.

Fragestellung: Es soll geklärt werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Anzahl von CD34+/CD133+ Stammzellen im Blut und dem Schweregrad der Herzinsuffizienz gibt.

Methodik: Aus dem venösen EDTA-Blut von 178 Patienten wurden zur Probenanalyse je  $0,3 \cdot 10^{-3}$  L für die Differentialblutbilder (DB) am Cell-Dyn<sup>®</sup> 4000 und  $1,5 \cdot 10^{-3}$  L für die Durchflusszytometrie am FACSCalibur<sup>™</sup> verbraucht. Zur Probenpräparation wurden aus je  $0,3 \cdot 10^{-3}$  L Blut die Erythrozyten mit FACS-Lyselösung zerstört, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Anti-CD34-FITC sowie Anti-CD133-PE angefärbt. Danach erfolgten die durchflusszytometrischen Messungen. Mit Cell-Quest Pro<sup>™</sup> wurden FSC-SSC-Dotplots erstellt und je ein Analysefenster (Gate) um die Lymphozytenpopulation gesetzt. Darin wurden aus je 200.000 Ereignissen (Gated Events) die mit Antikörpern markierten Zellen gezählt. Die Auswertung erfolgte mit FL1-FL2-Dotplots und den dazu gehörigen Quadrantenstatistiken (QS). Aus der Anzahl der detektierten Ereignisse pro Gated Events (aus QS) und den Lymphozytenzahlen (aus DB) wurde die Anzahl der CD34+/CD133+ Stammzellen sowie die der CD34+, CD34+/CD133–, CD133+ und CD133+/CD34– Zellen im Blut berechnet. Zusätzlich wurden bei 112 der herzinsuffizienten Patienten die BNP-Konzentrationen aus je  $0,1 \cdot 10^{-3}$  L EDTA-Blut mit dem Assay ADVIA<sup>®</sup> Centaur<sup>®</sup> bestimmt.

Ergebnisse: Die Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen sank mit dem Schweregrad der Herzschwäche signifikant ( $p \leq 0,004$ ). Nur zwischen NYHA I und NYHA II war dieser Abfall statistisch nicht zu sichern ( $p = 0,743$ ). Die Zahl der zirkulierenden CD34+ Zellen sank im Mittel ab NYHA II mit zunehmendem Schweregrad. Von NYHA I zu NYHA II gab es hier einen leichten Anstieg ( $p = 0,413$ ). Die CD34+/CD133– Zellzahl verhielt sich triphasisch mit einer Zunahme von NYHA I zu NYHA II ( $p = 0,037$ ), einem Abfall von NYHA II zu NYHA III ( $p < 0,001$ ) und einem erneuten Ansteigen von NYHA III zu NYHA IV ( $p = 0,470$ ). Die Anzahl der CD34+/CD133+, CD34+ sowie CD34+/CD133– Zellen war in den leichten Stadien (NYHA I+II) signifikant höher als in den schweren (NYHA III+IV) ( $p \leq 0,001$ ). Durchschnittlich 65% der CD34+ Zellen waren positiv für CD133. Dabei war ein höherer Anteil in NYHA I (71%) als in NYHA IV (53%) zu beobachten ( $p < 0,001$ ). Die

## 1. Zusammenfassung

CD133+ und CD133+/CD34- Zellzahlen zeigten keine von den Schweregraden abhängigen Veränderungen ( $p=0,319$ ,  $p=0,568$ ). Mit den NYHA-Gruppen korrelierten die CD34+/CD133+ ( $r=-0,412$ ,  $p<0,001$ ) und CD34+ Zellen negativ ( $r=-0,324$ ,  $p<0,001$ ), die CD34+/CD133- ( $r=-0,143$ ,  $p=0,057$ ), CD133+ ( $r=0,052$ ,  $p=0,490$ ) sowie CD133+/CD34- Zellen ( $r=0,073$ ,  $p=0,335$ ) dagegen nicht. Die BNP-Konzentrationen stiegen kontinuierlich von NYHA I ( $89,78^+/-102,35$  pg/ml) zu NYHA IV ( $2810,48^+/-1816,99$  pg/ml) ( $p<0,001$ ). Sie korrelierten positiv mit den NYHA-Gruppen ( $r=0,686$ ,  $p<0,001$ ) und negativ mit den CD34+/CD133+ Zellen ( $r=-0,326$ ,  $p=0,001$ ) sowie CD34+ Zellen ( $r=-0,209$ ,  $p=0,041$ ). Keine Korrelationen gab es zwischen dem BNP und den CD34+/CD133- Zellen ( $r=-0,063$ ,  $p=0,540$ ), den CD133+ Zellen ( $r=-0,047$ ,  $p=0,649$ ) und den CD133+/CD34- Zellen ( $r=-0,007$ ,  $p=0,950$ ). Der prozentuale Anteil der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen an den Leukozyten betrug im Mittel 0,007%, an den Lymphozyten 0,040%. Ein kardial akut dekompensierter Patient mit NYHA IV wurde nach klinischer Verbesserung der Symptome zu NYHA II ein zweites Mal untersucht. Die CD34+/CD133+ Zellzahl war von 0,16 auf 0,98 Zellen/ $\mu$ l angestiegen ( $>600\%$ ), die CD34+ Zellzahl von 0,37 auf 1,24 Zellen/ $\mu$ l ( $>300\%$ ). Die BNP-Konzentration war von 1975,97 auf 700,58 pg/ml abgesunken ( $>30\%$ ). Die CD34+/CD133- Zellzahl blieb fast unverändert bei 0,21 bzw. 0,26 Zellen/ $\mu$ l Blut.

Schlussfolgerungen: Die Ergebnisse zeigen, dass die Anzahl der primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz abnimmt. Dies kann durch eine Erhöhung ihres Verbrauchs, eine Störung ihrer Mobilisation aus dem Knochenmark, eine Verkürzung ihrer Überlebenszeiten, eine Bevorzugung alternativer Differenzierungswege oder durch andere Ursachen in den hohen NYHA-Stadien begründet sein. Mit der Messung der CD34+/CD133+ Zellzahl ist eine gute Unterscheidung zwischen der leichten (NYHA I+II) und schweren Herzschwäche (NYHA III+IV) mit Abgrenzung von NYHA I/II, NYHA III und NYHA IV möglich, nicht jedoch zwischen den Stadien NYHA I und NYHA II. Die Aussagekraft der CD34+/CD133+ Stammzellzahlen zur Klassifizierung der Herzschwäche ist der von CD34+, CD34+/CD133-, CD133+ und CD133+/CD34- Zellen überlegen. Zukünftig sollten spezifischere Marker etabliert und die Stammzellmessung mit einheitlichen Methoden angestrebt werden. Durch die frühe Erkennung niedriger Stammzellzahlen im Blut von Risikopatienten und rechtzeitig angewendete Stammzelltherapien könnte bereits die Entstehung der Herzinsuffizienz verhindert oder ihr Voranschreiten verzögert werden. Weitere Studien müssen dies prüfen. Zusammenfassend wird durch die Ergebnisse deutlich, dass die Abnahme der Anzahl von zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen mit dem Schweregrad das Voranschreiten der Herzinsuffizienz objektiviert, so dass es denkbar ist, die Stadieneinteilung zukünftig durch Quantifizierung dieser Stammzellen im Blut zu ergänzen.

## 2. Einleitung

## 2. Einleitung

### 2.1 Grundlagen der Herzinsuffizienz

#### 2.1.1 Definition

Unter Herzinsuffizienz versteht man das Unvermögen des Herzens, ein für den Organismus ausreichend großes Herzzeitvolumen auszuwerfen und/oder den Rückfluss venösen Blutes entsprechend aufzunehmen. Daraus ergibt sich ein Defizit zwischen dem Sauerstoffangebot und dem Sauerstoffbedarf der peripheren Gewebe bei Ruhe bzw. unter Belastung. Die Herzinsuffizienz ist ein Syndrom, das entweder durch das Vorliegen kardial bedingter klinischer Symptome (Dyspnoe, Flüssigkeitsretention, Leistungsschwäche und Müdigkeit) gekennzeichnet ist, die auf Füllungshindernissen oder einer mangelnden Pumpleistung beruhen, oder aber von einer symptomlosen Verminderung der Ejektionsfraktion (EF) des Herzens auf Werte unter 40 % bestimmt wird (Pichler 1999, Hoppe et al. 2005, Kompetenznetz Herzinsuffizienz 2004). Die linksventrikuläre EF kann daher im Vergleich zum Gesunden auch unverändert sein (Vasan et al. 1999).

#### 2.1.2 Epidemiologie

Die chronische Herzinsuffizienz gehört heute zu den häufigsten internistischen Erkrankungen in den modernen Industriestaaten, wobei schätzungsweise mehr als 10 Millionen Menschen in Europa betroffen sind (Hoppe et al. 2005). Es wird angenommen, dass die Prävalenz in Deutschland mehr als 2 Millionen beträgt (Parsi und Parsi 2001). Die Herzschwäche gehört hier zu den 20 häufigsten Diagnosen bei hospitalisierten Patienten (Statistisches Bundesamt Deutschland 2005). Erste Erkenntnisse zur Epidemiologie und den Risikofaktoren der Herzinsuffizienz ergab die Framingham Heart Study, deren Ergebnisse von weiteren Studien (Hillingdon Heart Failure Study, MONIKA Study der WHO, Rotterdam Study u.a.) bestätigt und ergänzt werden konnten. So sind Männer und Frauen ungefähr gleich häufig von Herzschwäche betroffen. Inzidenz und Mortalität sind beim männlichen Geschlecht insgesamt höher. Mit dem Lebensalter nehmen Prävalenz und die Sterblichkeitsrate bei beiden Geschlechtern zu (Ho et al. 1993, Mosterd et al. 2001). Im

## 2. Einleitung

Vergleich zum Herzgesunden ist die Mortalität beim Herzinsuffizienten um ca. das Vierfache erhöht (Vasan et al. 1999). Nach den Angaben des Statistischen Bundesamtes Deutschlands nahm die Mortalität der Herzinsuffizienz in den letzten Jahren beständig zu (Störk und Angermann 2007). Durch die zunehmende Lebenserwartung der Bevölkerung (Oeppen und Vaupel 2002) und die wachsende Überlebensrate nach Ereignissen wie dem Myokardinfarkt werden Inzidenz und Prävalenz in Zukunft weiter ansteigen (Senni et al. 1999, Schunkert 2003). Die Prognose der Herzinsuffizienz ist allgemein schlecht, besonders bei den hohen Schweregraden (Ho et al. 1993, Senni et al. 1998).

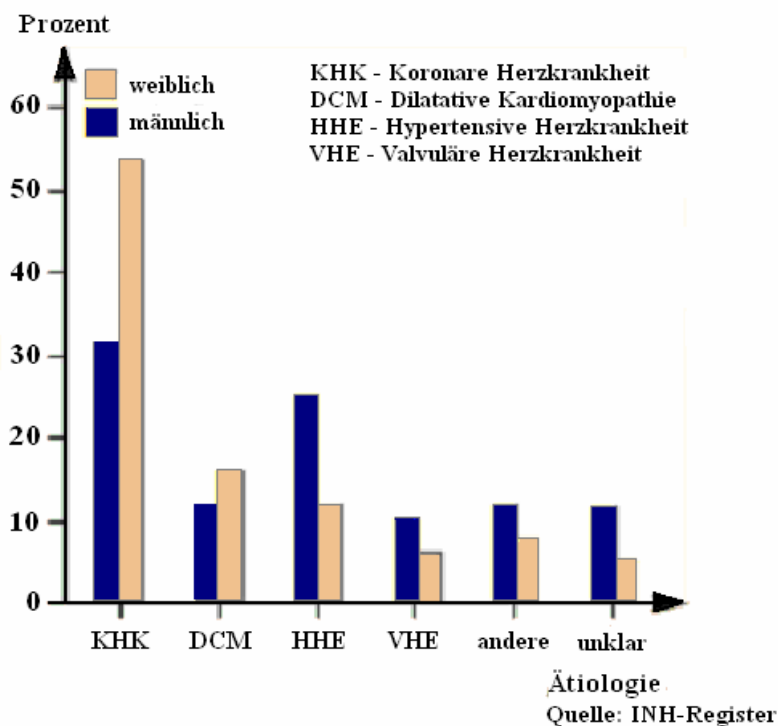
### 2.1.3 Formen der Herzinsuffizienz

Je nach Manifestation der Herzinsuffizienz gibt es mehrere Einteilungsmöglichkeiten. Die akute Herzinsuffizienz entsteht beim vorher gesunden Herzen durch massive, plötzlich eintretende und nicht zu bewältigende Missverhältnisse wie dynamische Pumpfunktionsbehinderungen oder akute Volumen-/Druckbelastungen. Dabei findet kein Myokardumbau statt. Bei der chronischen Herzinsuffizienz tritt das Pumpversagen dagegen langsam, aber progredient ein. Der Organismus kann die funktionelle Einschränkung des Herzens über verschiedene Gegenregulationsmechanismen wie das Myokardremodeling, die Ausschüttung natriuretischer Peptide oder die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems eine Zeit lang tolerieren. Von akuter Dekompensation spricht man, wenn eine kompensierte chronische Herzschwäche plötzlich entgleist. Andere Einteilungen unterscheiden Vorwärts- und Rückwärtsversagen, Links- und Rechtsherzschwäche oder differenzieren zwischen systolischen und diastolischen Funktionsstörungen. Die systolische Dysfunktion äußert sich durch pathologische Kontraktionsstörungen des Myokards mit einer verminderten EF des Herzens (Hess 2003). Die diastolische Dysfunktion hingegen ist durch Füllungsstörungen mit einer kaum verminderten Auswurfleistung gekennzeichnet (European Study Group on Diastolic Heart Failure 1998, Stainback 1999). Beide Formen kommen ungefähr gleichhäufig vor (Vasan et al. 1999). Bei schätzungsweise der Hälfte der Patienten liegen keinerlei klinische Symptome vor, weshalb die Diagnose Herzinsuffizienz oft erst spät gestellt wird. Therapiebedürftig ist jede Herzschwäche mit bestehender klinischer Symptomatik sowie ab einer EF unter 40 %, auch ohne Vorhandensein von körperlichen Beschwerden (Hoppe et al. 2005).

## 2. Einleitung

### 2.1.4 Ursachen: Ätiologie und Risikofaktoren

Bei der Entstehung der chronischen Herzschwäche kommt eine Reihe von Vorerkrankungen in Betracht. In der Framingham Heart Study ragte besonders die chronische Hypertonie als auslösender Faktor heraus (Kannel et al. 1972, Kilter und Böhm 2004). Es wird jedoch angenommen, dass die Koronare Herzkrankheit (KHK) einen weitaus höheren ätiologischen Anteil hat, da ein Myokardinfarkt der Herzschwäche häufig vorausgeht (McMurray und Stewart 2000, Scottish Intercollegiate Guidelines Network 2007). Weitere wichtige Vorerkrankungen der Herzinsuffizienz sind Kardiomyopathien, Klappenfehler und Myokarditiden, wobei der konkrete Auslöser besonders beim multimorbiden Patienten oft nicht mehr eindeutig zu eruieren ist (McMurray und Stewart 2000). Die Hauptursache der Herzinsuffizienz in Deutschland ist nach dem INH- (Interdisziplinäres Netzwerk Herzinsuffizienz) Register der Universität Würzburg bei beiden Geschlechtern überwiegend die KHK (ischämisch). In zweiter Linie ist die Herzinsuffizienz bei Männern hypertensiv, bei Frauen dagegen dilatativ bedingt (Störk und Angermann 2007). Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 graphisch dargestellt.



**Abbildung 1:** Graphische Darstellung der verschiedenen Ätiologieformen und ihren prozentualen Anteilen bei der Entstehung der Herzinsuffizienz. (Störk und Angermann 2007)

## 2. Einleitung

Weitere mögliche, jedoch weitaus seltener vorkommende Auslöser der chronischen Herzinsuffizienz sind Stoffwechselstörungen, wie die Hyperthyreose (Karow et al. 1998), endokrine Tumoren des Nebennierenmarkes mit Adrenalinproduktion (Phäochromozytom) (Mauser et al. 2001), angeborene Herzfehler und Perikarderkrankungen sowie schwere Fettleibigkeit (Kenchiah et al. 2002). Nicht zu unterschätzen sind auch kardiotoxische Medikamente, wie z.B. Anthrazykline (Minotti et al. 2004), Trastuzumab (Herceptin®) (Keefe 2002), Cyclophosphamid (Hoppe 2007), selektive Serotonin-Re-Uptake-Hemmer und trizyklische Antidepressiva (Roose 2000, Roose und Miyazaki 2005) sowie Interferone (Sonnenblick und Rosin 1991). Unter den Drogen kommt besonders Alkohol (Hajnoczky et al. 2005), Nikotin (Kaesemeyer 1994), Kokain (Pozner et al. 2005) und Amphetaminen (Jacobs 2006) Bedeutung bei der Entstehung einer Herzschwäche zu. Aber auch genetische Faktoren spielen eine Rolle. Dabei stellen sowohl Eltern als auch Geschwister mit kardiovaskulären Erkrankungen Risikofaktoren für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung dar (Lloyd-Jones et al. 2004, Murabito et al. 2005). Neben hohem Lebensalter sind auch Diabetes mellitus, Herzrhythmusstörungen (z.B. Vorhofflimmern) sowie Hypercholesterolämie weitere bedeutende Risikofaktoren der chronischen Herzinsuffizienz (Hess 2003, Werner 2006). Es besteht ein enger Zusammenhang mit den Risikofaktoren der KHK (Wilson et al. 1998, Grundy et al. 1999).

### 2.1.5 Stadieneinteilung: NYHA-Klassifikation

Die chronische Herzinsuffizienz ist eine klinische Diagnose. Eine Stadieneinteilung nach dem vorliegenden Schweregrad ist besonders für die Therapie sowie für Aussagen über die Prognose von Bedeutung. Eine international gebräuchliche Einteilungsmöglichkeit ist die 1928 eingeführte NYHA-Klassifikation. Hierbei wird die funktionelle Leistungsfähigkeit des Patienten bewertet und in vier Schweregrade unterteilt. Als Parameter für die Einschätzung der körperlichen Belastbarkeit dienen klinische Symptome der kardialen Dysfunktion wie zum Beispiel Erschöpfung, Dyspnoe, Zeichen der Flüssigkeitsretention, Angina-pectoris-Schmerzen und Herzrhythmusstörungen (Hoppe et al. 2005). Mit ansteigendem NYHA-Stadium steigt die Mortalität und es sinkt die Lebensqualität signifikant (Hobbs et al. 2002). In Tabelle 1 sind die Definitionen der vier NYHA-Stadien im Überblick zusammengestellt.



## 2. Einleitung

**Tabelle 1: Stadieneinteilung der Herzinsuffizienz nach der NYHA-Klassifikation. (Hoppe et al. 2005)**

NYHA	Funktionelle Klassifizierung
I	Herzerkrankung ohne körperliche Limitation. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine inadäquate Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
II	Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Alltägliche körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
III	Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
IV	Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe. Bettlägerigkeit.

### 2.2 B-Typ natriuretisches Peptid (BNP)

BNP ist ein aus 32 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon, das in Herzmuskelzellen des linken Ventrikels aus der Vorstufe ProBNP gebildet wird. Bei hohen Druckverhältnissen im Ventrikel zerfällt das ProBNP in das aktive BNP und das größere, jedoch inaktive NT-proBNP. Beide werden ins Blut abgegeben und können darin laborchemisch nachgewiesen werden (Müller et al. 2004). Der Abbau von BNP erfolgt enzymatisch mit Endopeptidasen und durch Endozytose (Davidson et al. 1996). Die biologische Halbwertszeit des BNP beträgt in vivo ca. 20 Minuten (Homles et al. 1993). BNP wirkt gefäßerweiternd und fördert die Natrium- und Wasserausscheidung über die Nieren. Dadurch wird der Blutdruck gesenkt. BNP korreliert gut mit dem Schweregrad der Herzschwäche und hat sich zudem in der Akutdiagnostik von Dyspnoe zur Differenzierung zwischen kardialer und pulmonaler Genese bewährt (Brunner-La Rocca 2003). Der Algorithmus „akute Luftnot“ nutzt ein BNP-Cutoff von 100 pg/ml (Tabbibizar und Maisel 2002). Herzgesunde haben ein BNP von unter 80 pg/ml (Dao et al. 2001). Ab 80 pg/ml steigt die Mortalitätsrate signifikant (De Lemos et al. 2001). Die BNP-Konzentration ist sowohl bei der systolischen als auch der diastolischen Dysfunktion erhöht (Kitzman et al. 2002). Sie kann auch bei der pulmonalen Hypertonie, einer Niereninsuffizienz oder systemischen Infekten ansteigen (Brunner-La Rocca 2003). Außerdem nimmt BNP im Alter zu und ist bei Frauen höher als bei Männern (Redfield et al. 2002). Bei Adipositas ist es erniedrigt (Mehra et al. 2004).

## 2. Einleitung

### 2.3 Endotheliale Progenitorzellen und primitive CD34+/CD133+ Stammzellen

#### 2.3.1 Endotheliale Progenitorzellen (EPC)

Die Endothelialen Progenitorzellen (EPC) umfassen die Gesamtheit aller Vorläuferzellen, welche proangiogene und provaskulogene Eigenschaften besitzen. Die Angiogenese beschreibt eine Aussprossung von Gefäßen aus bereits vorhandenen Gefäßstrukturen. Hierbei erfolgt eine Teilung von adulten Endothelzellen. Ihre proliferative Potenz ist gering (Bompais et al. 2004). Die Vaskulogenese ist dagegen die Neubildung eines primitiven Gefäßnetzwerkes durch EPC (Carmeliet 2004). Diese werden aus dem Knochenmark ins periphere Blut mobilisiert und differenzieren dort zu den so genannten Angioblasten (Lin et al. 2000). Angioblasten besitzen eine hohe proliferative Potenz und können nach entsprechender Induktion neue Gefäßlumina bilden. Früher wurde angenommen, dass die Gefäßneubildung aus Stammzellen nur im embryonalen Organismus möglich ist. Asahara et al. entdeckte erstmals, dass CD34+ Zellen aus der Leukozytenfraktion des peripheren Blutes postnatal und in Kultur zu endothelartigen Zellen differenzieren und in vivo an verletzte Gefäßwände adhärieren (Asahara et al. 1997). Weitere Arbeitsgruppen wiesen diese Eigenschaften mittlerweile bei sehr unterschiedlich charakterisierten Zellpopulationen nach, so dass angenommen wird, dass es sich bei den EPC insgesamt um eine sehr heterogene Gruppe handelt (Hur et al. 2004).

#### 2.3.2 Phänotypen von Endothelzellen und zirkulierenden EPC

Reife Endothelzellen sind charakterisiert durch Oberflächenmarker wie z.B. VE-Cadherin, vWF, Tie-Rezeptoren (Korhonen et al. 1992), E-Selektin, Endoglin (CD105), VEGFR-2 (KDR, flk-1), PECAM-1 (CD31) (Newman 1994, Asahara et al. 1997, Dimmeler et al. 2001), den Einbau von Ulex-lectin und acetyliertem LDL (Voyta et al. 1984) sowie durch funktionelle Besonderheiten, wie die NO-Produktion/Sekretion mit Hilfe der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) (Asahara et al. 1997, Aicher et al. 2003).

CD34+ Stammzellen aus der Leukozytenfraktion des peripheren Blutes waren die ersten Zellen, bei denen postnatal gefäßbildende Eigenschaften nachgewiesen wurden (Asahara et al. 1997). Neben Anti-CD34 wurden weitere Oberflächenmarker bei der Suche nach Vorläufern der Endothelzellen etabliert. Am bedeutendsten waren hierbei lange Zeit

## 2. Einleitung

Antikörper gegen CD133 und VEGFR-2 (Yin et al. 1997, Gehling et al. 2000). Die CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/VEGFR2<sup>+</sup> Stammzellen können sich sowohl zu Endothelzellen als auch zu hämatopoetischen Zellen differenzieren (Asahara et al. 1997, Peichev et al. 2000, Umeda et al. 2006) und gelten deshalb als mögliche Ursprungspopulation beider Zellreihen (Rafii 2000, Schmeisser und Strasser 2002, Urbich und Dimmeler 2004). Eine genaue Abgrenzung der endothelialen Progenitorzellen ist auch mit dieser Markerkombination nicht eindeutig möglich (Case et al. 2007). Bisher gibt es keinen Konsens zur einheitlichen Charakterisierung der endothelialen Vorläuferzellen. Daher werden von verschiedenen Arbeitsgruppen auch unterschiedliche Markerkombinationen verwendet. Die Oberflächenantigene CD34, CD133 und VEGFR-2 sind in mehreren Reifungsstadien der endothelialen Vorläuferzellen vorhanden. Die CD34<sup>+</sup> Zellen der hämatopoetischen Reihe verlieren die Fähigkeit zur Expression von CD133 und VEGFR-2 schon während ihrer frühen Differenzierung (Yamaguchi et al. 1993, Peichev et al. 2000). Erschwert wird die Identifizierung der endothelialen Vorläuferzellen zusätzlich dadurch, dass neben den CD34<sup>+</sup> Zellen auch Monozyten/Makrophagen proarteriogene Eigenschaften besitzen sollen (Arras et al. 1998, Heil et al. 2002). Monozyten/Makrophagen sind durch Oberflächenantigene wie CD14 und CD45 charakterisiert (Heidenreich 1999). Das Antigen VEGFR-2 tragen sie nicht und CD34 und CD133 sind nicht regelmäßig nachweisbar (Peichev et al. 2000). Ihre Vorläufer, die myeloiden Stammzellen, hingegen tragen CD34 (Fina et al. 1990) und sind teilweise auch positiv für CD133 (Kobari et al. 2001). Werden CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> Zellen kultiviert, dann können sie ebenfalls endothelzellspezifische Oberflächenantigene ausbilden und an verletztem Endothel adhären. Dabei gibt es keine Unterschiede zwischen Isolaten aus dem Knochenmark und dem peripheren Blut (Schmeisser et al. 2001, Urbich et al. 2003, Fujiyama et al. 2003). Außerdem konnte durch das monozytenstimulierende Chemokin MCP-1 beim Kaninchen eine vorübergehende Beschleunigung der Vaskulogenese nachgewiesen werden (van Royen et al. 2003). Die proliferative Potenz der von Monozyten/Makrophagen abstammenden gefäßbildenden Progenitorzellen ist jedoch im Vergleich zu den CD34<sup>+</sup> Stammzellen eher gering und beim Einsatz unkultivierter Monozyten überhaupt nicht zu beobachten (Rehmann et al. 2003, Urbich et al. 2003). Da die von den Monozyten abstammenden EPC Wachstumsfaktoren wie VEGF, HGF, G-CSF und GM-CSF produzieren, die dafür bekannt sind, die Angio- und Vaskulogenese zu aktivieren (Pepper et al. 1992, Isner und Asahara 1999), wird vermutet, dass ihr proangiogener Effekt hauptsächlich darauf zurückzuführen ist (Rehmann et al. 2003) und die Monozyten somit zu den „frühen“ EPC gehören (Hur et al. 2004).

## 2. Einleitung

### 2.3.3 Primitive zirkulierende CD34+/CD133+ Stammzellen

Die Population der primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen ist bisher noch nicht eindeutig charakterisiert. Sie umfasst wahrscheinlich sowohl die endothelialen als auch die hämatopoetischen Stammzellen sowie alle frühen und späten EPC bis zu ihrer Ausreifung zu adulten Endothelzellen. Die Reifung dieser Stammzellen geht mit dem Verlust des Oberflächenantigens CD133 einher (Peichev et al. 2000). Die CD34+/CD133+ Stammzellen stellen die wahrscheinlich primitivste Stammzellpopulation des peripheren Blutes dar (Schatteman 2005). Sie tragen zur Gruppe der „frühen“ EPC bei und können auch zu „späten“ EPC differenzieren (Hur et al. 2004). Bei der Entwicklung zu Endothelzellen von Blutgefäßen wurde eine Coexpression von VEGFR-2 beschrieben (Peichev et al. 2000), bei der zu Endothelzellen von Lymphgefäßen eine Coexpression von VEGFR-3 (Salven et al. 2003). Zudem sezernieren die primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen Ang-1, Ang-2 sowie VEGF und wirken auf diese Weise insgesamt aktivierend auf die Neovaskulogenese (Pomyje et al. 2003). In Untersuchungen wurde ein positiver Zusammenhang zwischen der Anzahl von primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen und dem Blutflussindex im koronaren Kollateralsystem des Herzens nachgewiesen (Lambiase et al. 2004). Die Mobilisation der primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen ist von Wachstumsfaktoren abhängig. So kann ihre Anzahl im peripheren Blut z.B. durch Gabe von G-CSF sowohl bei Gesunden (Stroncek et al. 1997) als auch bei KHK-Patienten (Powell et al. 2005, Honold et al. 2006) und nach akutem Myokardinfarkt erhöht werden (Takano et al. 2006).

### 2.3.4 Oberflächenantigene der primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen

#### 2.3.4.1 CD34

Das CD34-Antigen ist ein membranständiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 115 kD. Es gehört zur Gruppe der Sialomucine (Civin et al. 1984, Andrews et al. 1986). Exprimiert wird CD34 u.a. auf der Zellmembran von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (Krause et al. 1994), auf zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen (Peichev et al. 2000) sowie auf der luminalen Seite von ausgereiften Endothelzellen kleiner Gefäße (Fina et al. 1990). Im Vergleich zu den Vorläuferzellen wird die CD34-Expression

## 2. Einleitung

bei den heranreifenden Endothelzellen auf Grund der Zellteilungsvorgänge herunter reguliert (Delia et al. 1993). Bei den hämatopoetischen Stammzellen von Mäusen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die CD34-Expression reversibel ist (Sato et al. 1999). Adulte hämatopoetische Zellen verlieren damit die Fähigkeit zur CD34-Expression (Asahara et al. 1997) und sind somit CD34-negativ (Yin et al. 1997). CD34 kann zudem auf murinen embryonalen Fibroblasten und im embryonalen Gehirn nachgewiesen werden (Brown et al. 1991). Außerdem wird CD34 von humanen lymphoendothelialen Zellen (Fiedler et al. 2006), von humanen kornealen Keratozyten (Parrella et al. 2007) sowie von Zellen in Teratokarzinoma sowie Retinoblastoma (Yin et al. 1997) exprimiert. Die Funktion von CD34 liegt wahrscheinlich in der eines Adhäsionsmoleküls (Healy et al. 1995, Fina et al. 1990). Dabei konnte gezeigt werden, dass es zu Bindungen zwischen dem CD34 und dem L-Selektin kommt, das sich auf Endothelzellen befindet und für den Zell-Zell-Kontakt von großer Bedeutung ist (Baumhueter 1993, Baumhueter et al. 1994). Das Antigen CD34 besitzt verschiedene Epitope. Diese werden in drei Klassen eingeteilt. Die Epitope der Klasse I können z.B. mit den Antikörpern My-10, 12.8, B1.3C5, IMMU-133, IMMU-409 und ICH-3 nachgewiesen werden, die Epitope der Klasse II z.B. mit QBEND-10 und die Epitope der Klasse III z.B. mit 581, TUK-3, 115.2, 8G12 und 8.12 (Sutherland et al. 1992, Barrande et al. 1993, Serke und Huhn 1996). Auf CD34+ Zellen überwiegt die Expression von Epitopen der Klasse III. Die Expression von Epitopen der Klasse I und Klasse II wird während der weiteren Differenzierung dieser Zellen zudem auch eher herunter reguliert (Steen et al. 1996).

### 2.3.4.2 CD133

Das CD133-Antigen (Synonyme: AC133, Prominin) ist ein 5-Transmembran-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 120 kD (Yin et al. 1997). Exprimiert wird es von Vorläuferzellen der hämatopoetischen (Yin et al. 1997) und endothelialen Reihe (Gehling et al. 2000), darunter auch von lymphoendothelialen Progenitorzellen (Salven et al. 2003). Da CD133 während der weiteren Differenzierung verloren geht, gilt dieses Membranprotein als Marker der frühen Stamm- und Progenitorzellen (Peichev et al. 2000). Positiv für CD133 sind aber auch nicht hämatopoetische Zellen wie z.B. neuronale Stammzellen und Glia (Uchida et al. 2000) oder humane korneale Keratozyten (Parrella et al. 2007). Auch auf einigen epithelialen Geweben, wie den Nierentubuli und den Milchgängen der Brustdrüse, wurde CD133 bereits gefunden und kann außerdem bei

## 2. Einleitung

einigen Tumoren nachgewiesen werden (Florek et al. 2005). Dabei exprimieren neben Retinoblastoma und Teratoblastoma auch monozytäre Leukämiezellen dieses Oberflächenprotein (Delfini 2002). Ausgebildet wird CD133 bei Epithelzellen auf den mikrovillösen Strukturen der Zellmembran, bei nicht epithelialen Zellen auf plasmamembranösen Vorstülpungen (Weigmann et al. 1997). Die Funktion ist noch unbekannt. Es wird vermutet, dass CD133 einen Anteil an der Organisation der Plasmamembranprotrusionen hat (Corbeil et al. 2001).

### **2.3.5 Abstammung und Differenzierungswege der CD34+/CD133+ Stammzellen**

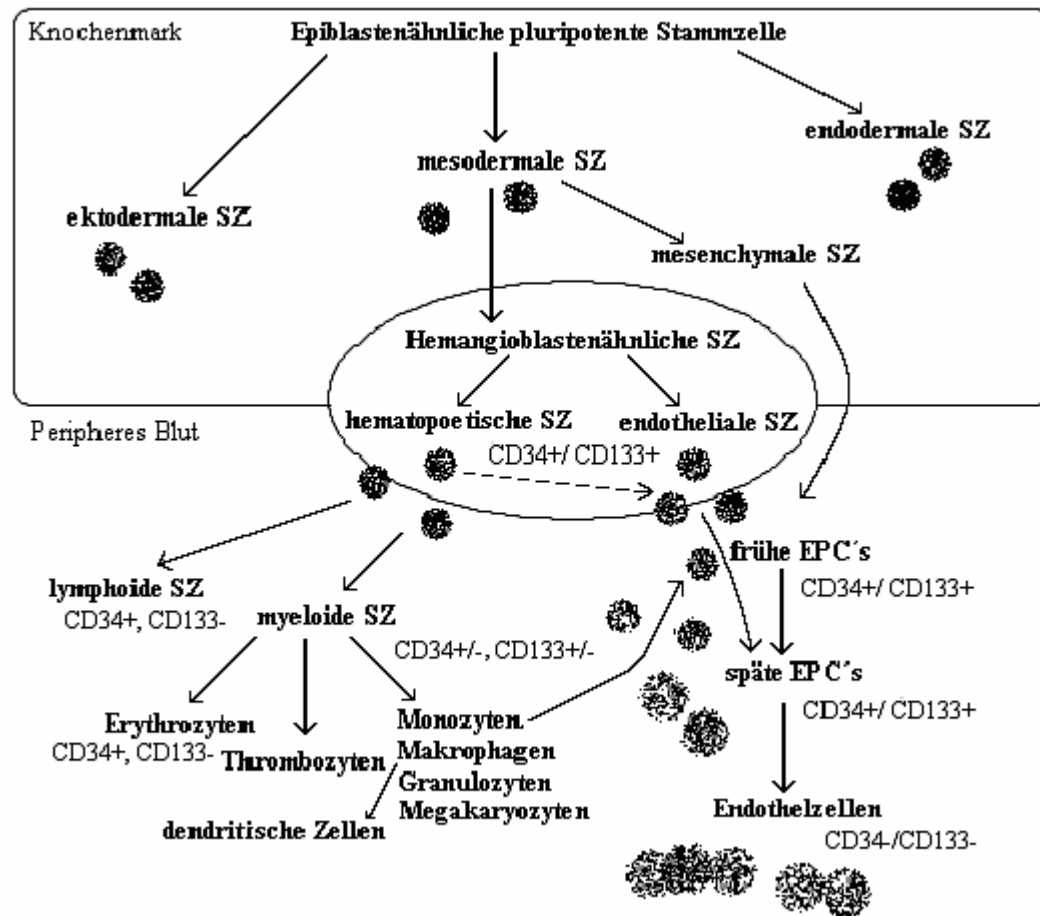
Durch allogene Knochenmarkstransplantation bei Hunden wurde gezeigt, dass die CD34+ Zellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut mobilisiert werden und sich dort zu hämatopoetischen und endothelialen Zellen entwickeln (Shi et al. 1998, Bhattacharya et al. 2000, Crosby et al. 2000). Sie stammen von mesodermalen Stammzellen ab (Huang et al. 2007). Daneben kommen CD34– Zellen als mögliche Ursprungspopulation in Frage, die nach Kultivierung zu CD34+ Stammzellen differenzieren können (Nakamura et al. 1999, Gallacher et al. 2000, Kuci et al. 2002, Friedrich et al. 2006). Im embryonalen Dottersack wurde der Hämangioblast als gemeinsamer Vorläufer von hämatopoetischen und endothelialen Stammzellen identifiziert (Sabin 1920, Murray 1932). Der embryonale Hämangioblast ist mesodermaler Herkunft (Asahara 2004). Er stammt vermutlich von epiblastenähnlichen, pluripotenten Stammzellen des Knochenmarkes ab. Flamme et al. stimulierten in vitro so genannte embryonale Epiblasten mit FGF und isolierten daraus anschließend sowohl hämatopoetische als auch endotheliale Progenitorzellen. Diese formierten sich in so genannten Blutinseln. Dabei häuften sich die hämatopoetischen Zellen im Zentrum und die Angioblasten in deren Randbereichen (Flamme und Risau 1992).

Auch im postnatalen Organismus deuten mehrere Befunde auf einen gemeinsamen Ursprung von hämatopoetischen und endothelialen Stammzellen hin. So wurde bei den Vorläuferzellen beider Reihen etwa die Expression gleicher Gene (z.B. TAL-1/SCL) und das Vorhandensein identischer Oberflächenproteine (z.B. CD34, CD133, VEGFR-2) nachgewiesen (Peault et al. 1983, Asahara et al. 1997, Choi et al. 1998, Peichev et al. 2000, Umeda et al. 2006). Daneben konnte bei beiden eine erhöhte Mobilisation durch Stimulation mit identischen Wachstumsfaktoren erreicht werden, z.B. durch G-CSF

## 2. Einleitung

(Kocher et al. 2001, Robinson et al. 2005, Honold et al. 2006), Erythropoetin (Heeschen et al. 2003, Bahlmann et al. 2004), VEGF, HGF und verschiedene Zytokine (Majka et al. 2001) sowie GM-CSF (van Royen et al. 2005). Es wird angenommen, dass die hämatopoetischen Stammzellen im adulten Organismus die Aufgabe der Hämangioblasten übernehmen, da aus diesen sowohl hämatopoetische als auch endotheliale Zellen differenzieren (Grant et al. 2002, Pelosi et al. 2002). Die frühen Populationen der hämatopoetischen und endothelialen Progenitorzellen sind bisher noch nicht klar voneinander abgrenzbar. Bekannt ist, dass bei beiden der NO-Signalweg eine bedeutende Rolle spielt, da er sowohl die Blutzell- als auch die Gefäßbildung beeinflusst (Guthrie et al. 2005). Hur et al. beschrieb, dass im peripheren Blut „frühe“ und „späte“ EPC zirkulieren, die sich morphologisch, funktionell und auch im Wachstumsverhalten voneinander unterscheiden. Die „frühen“ EPC sind eine heterogene Gruppe und insbesondere wohl durch die Sekretion von angiogenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie VEGF, HGF, IL-8 und G-CSF gekennzeichnet. Die „späten“ EPC, die zu einem Teil aus den „frühen“ EPC hervorgehen können, sind dagegen homogen gut charakterisiert, produzieren mehr NO und entwickeln sich zu ausgereiften Endothelzellen. Keinen Unterschied weisen beide Typen bei der Aufnahme von acetyliertem LDL auf (Hur et al. 2004). Monozyten/Makrophagen scheinen ebenfalls zur endothelialen Vaskulogenese beizutragen und auch eine Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu endothelialen Zellen ist beschrieben worden (Davani et al. 2003). Es wurde gezeigt, dass sich die CD34+/CD133+/VEGFR-2+ Stammzellen weiter zu CD34+/CD133-/VEGFR2+ Stammzellen entwickeln (Friedrich et al. 2006). In Abbildung 2 sind die Phänotypen der Abstammungs- und die Differenzierungswege von CD34+/CD133+ Stammzellen zu den Zellen der hämatopoetischen sowie endothelialen Reihe des peripheren Blutes zusammengefasst und graphisch dargestellt. Bei den angegebenen Oberflächenantigenen der Zellen wurde sich auf die Darlegung der untersuchten Antikörper CD34 und CD133 beschränkt. Die hier als hämangioblastenähnliche Stammzellen bezeichneten Vorläufer von hämatopoetischen und endothelialen Stammzellen sind noch nicht genau erforscht. Ihre Existenz ist bisher nur im embryonalen Organismus bewiesen. Die um diese drei Stammzellpopulationen gezeichnete Ellipse stellt daher ein noch nicht genau erforschtes Gebiet der Wissenschaft dar. Auch die genaue phänotypische Charakterisierung der einzelnen Blutzellen unterliegt gegenwärtig noch der Forschung.

## 2. Einleitung



**Abbildung 2:** Abstammung und Differenzierungswege der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen zu den Zellen der endothelialen und hämatopoetischen Reihe.

(modifiziert nach Yin (1997), Kobari (2001), Davani (2003), Asahara (2004), Hristov (2004), Hur (2004), Iwami (2004) und Urbich (2004))



## 2. Einleitung

### 2.3.6 Einflussfaktoren auf die Anzahl der zirkulierenden CD34+ Stammzellen

Eine verminderte Anzahl von gefäßbildenden Stammzellen wurde bei Diabetes mellitus Typ I (Loomans et al. 2004) und Typ II (Tepper et al. 2002), chronischer Niereninsuffizienz (Choi et al. 2004), Rauchern (Kondo et al. 2004) und im hohen Lebensalter (Scheubel et al. 2003, Shaffer et al. 2006) beobachtet. Auch bei ischämiebedingten Erkrankungen, wie der PAVK (Yamamoto et al. 2004) oder der KHK (Vasa et al. 2001b, Powell et al. 2005) sowie verbunden mit hohen CRP-Konzentrationen (Verma et al. 2004) sind die Zahlen gefäßbildender Stammzellen vermindert.

Erhöhte Werte hingegen zeigen sich unter dem Einfluss von Östrogenen (Strehlow et al. 2003), bei sportlicher Betätigung (Adams et al. 2004, Laufs et al. 2004), dem Vorhandensein von Tumoren, wie z.B. Brustkrebs (Fürstenberger et al. 2006), nach einem akuten Myokardinfarkt (Shintani et al. 2001, Massa et al. 2005, Grundmann et al. 2007), induziert durch Ischämie (Takahashi et al. 1999) oder nach vaskulären (Gill et al. 2001) sowie muskulären Traumata (Laing et al. 2007). Auch verschiedene Medikamente, wie z.B. Erythropoetin (EPO) (Heeschen et al. 2003, Bahlmann et al. 2004) oder Statine (HMG-CoA-Reduktasehemmer) (Vasa et al. 2001a, Werner et al. 2002) sollen mit einem Ansteigen der Anzahl gefäßbildender Stammzellen verbunden sein.

### 3. Fragestellung und Zielsetzung

Die Therapie der chronischen Herzinsuffizienz wird zukünftig eine wachsende Kostenbelastung des Gesundheitssystems darstellen. Die Prognose ist überwiegend ungünstig und die Prävalenz steigt stetig an. Nicht nur der westliche Lebenswandel, sondern auch die verbesserten Therapiemöglichkeiten ihrer Vorerkrankungen, die z.B. die Überlebensrate nach einem Myokardinfarkt steigern, begünstigen die Entwicklung der Herzschwäche. Daher müssen wirkungsvollere Wege gefunden werden, diese Erkrankung rechtzeitig zu diagnostizieren, den Übergang von einer Vorerkrankung zur Herzschwäche zu erkennen und das Voranschreiten einer bestehenden Herzinsuffizienz zu verlangsamen oder sogar aufzuhalten. Die Erkrankung ist durch eine verminderte Sauerstoffversorgung der peripheren Gewebe und des Myokards charakterisiert. Es liegt ein Endothelschaden vor (Katz et al. 1999, Chong et al. 2004) und die Entwicklung der Herzschwäche geht zudem mit einer Schädigung der Herzmuskelzellen einher (Li et al. 1997). Es ist bekannt, dass im peripheren Blut CD34+ Stammzellen zirkulieren, die an der Bildung neuer Blutgefäße beteiligt sind (Asahara et al. 1997) und daneben auch die Fähigkeit haben sollen, zu Herzmuskelzellen zu differenzieren (Müller et al. 2002, Badorff et al. 2003). Von mehreren Arbeiten wurden bereits die Vorteile von verschiedenen therapeutischen Anwendungen dieser CD34+ Stammzellen bei ischämischen Herzerkrankungen beschrieben. Die CD34+/CD133+ Zellen sind wahrscheinlich die primitivsten dieser zirkulierenden CD34+ Stammzellen (Schatteman 2005). Einige Studien haben gezeigt, dass die Anzahl der primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen bei ischämischen Erkrankungen, wie der PAVK (Yamamoto et al. 2004) und der KHK (Powell et al. 2005), vermindert ist. Valgimigli et al. untersuchten bereits die Anzahl der zirkulierenden CD34+ sowie CD34+/CD133+/VEGFR-2+ Stammzellen im peripheren Blut von Patienten mit Herzinsuffizienz unterschiedlicher Schweregrade. Die Arbeitsgruppe fand einen Abfall in der Anzahl dieser beiden Zellpopulationen mit dem ansteigenden NYHA-Stadium (Valgimigli et al. 2004). Bisher gibt es keine Untersuchungen dazu, wie sich die Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen in den Schweregrade der Herzinsuffizienz verhält und ob es stadienabhängige Veränderungen gibt. Ziel der Arbeit ist, ein besseres Verständnis für die phänotypisch als CD34+/CD133+ charakterisierten primitiven Stammzellen im Zusammenhang mit der Herzschwäche zu erlangen und einen möglichen Nutzen sowie die Grenzen der Messung ihrer Anzahl im Blut zu diskutieren.

## 4. Patientenkollektiv und Materialien

### 4.1 Patientenkollektiv

Von 178 erwachsenen Patienten, die wegen Herzinsuffizienz im Universitätsklinikum Jena ambulant oder stationär in Behandlung waren, wurde venöses EDTA-Vollblut entnommen. Alle Patientendaten wurden anonymisiert. Die Teilnahme an der Studie war freiwillig. Die Teilnehmer waren aufgeklärt und stimmten der Studie schriftlich zu. Die Einteilung der Patienten erfolgte nach den Schweregraden der Herzschwäche. Sie wurde nach den aktuellen Richtlinien der NYHA-Klassifikation in die Gruppen NYHA I bis NYHA IV vorgenommen. Die Gruppe NYHA I bestand aus  $n_1 = 44$ , NYHA II aus  $n_2 = 47$ , NYHA III aus  $n_3 = 53$ , und NYHA IV aus  $n_4 = 34$  Patienten. In die Studie wurden ausschließlich männliche Patienten einbezogen, um einen möglichen Effekt von Östrogen auf die Anzahl der CD34+/CD133+ Stammzellen auszuschließen. Nicht in die Studie eingeschlossen wurden Patienten mit einem bekannten Tumorleiden, Sepsis oder kürzlich vorausgegangener Traumatisierung, wie z.B. einer Operation. Das Durchschnittsalter der Probanden lag bei  $61 \pm 13$  Jahren. Die Genese der Herzschwäche im Kollektiv war überwiegend ischämisch (43,2 %), dilatativ (29,7 %) sowie hypertensiv (16,8 %) bedingt. Entzündliche (5,4 %) und valvuläre Ursachen (4,9 %) waren selten. Von dem Blut der Patienten wurden  $0,3 \cdot 10^{-3}$  L für die Erstellung von Differentialblutbildern am Cell-Dyn<sup>®</sup> 4000 Blutanalysegerät,  $1,5 \cdot 10^{-3}$  L für die durchflusszytometrischen Untersuchungen am FACSCalibur<sup>™</sup> Durchflusszytometer und  $0,1 \cdot 10^{-3}$  L für die Bestimmungen der BNP-Konzentration mit dem ADVIA<sup>®</sup> Centaur<sup>®</sup> Immunoassay verbraucht. Die Ethikkommission hat den durchgeführten Untersuchungen zugestimmt (Nr.: 1681-12/05).

## 4. Patientenkollektiv und Materialien

### 4.2 Materialien

#### 4.2.1 Chemikalien

Aqua ad injectabilia (deionisiertes Wasser)	Braun
FACS Lysing Solution (Lyselösung), 10-fach konzentriert	BD Biosciences
FACS Flow <sup>TM</sup> (Trägerflüssigkeit)	BD Biosciences
FACS Safe <sup>TM</sup> (Desinfektionslösung)	BD Biosciences
FACS Rinse <sup>TM</sup> (Reinigungslösung)	BD Biosciences
Fc-Blocking Reagenz	Miltenyi Biotec
PBS-Tabletten	SIGMA-Aldrich
Sheath-Reagenz	Abbott
WBC-Reagenz, Teil A und Teil B	Abbott

#### 4.2.2 Verbrauchsmaterialien

EDTA-Monovetten (9 ml)	Sarstedt
Analyseröhrchen, Falcon <sup>TM</sup> (5ml)	BD Biosciences
Reaktionsgefäße (2 ml)	Eppendorf
Pipettenspitzen (0,5-10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Brand
Handschuhe SensiClean <sup>®</sup>	Ansell
wasserfester Stift	Centropen
Desinfektionsspray Softasept <sup>®</sup>	Braun

## 4. Patientenkollektiv und Materialien

### 4.2.3 Antikörper

#### CD34

Fluoreszenzmarkierung:	FITC
Spezifität:	anti-human, Antigen CD34, Epitop 3
Herkunft:	monoklonaler Antikörper von der Maus
Klon:	581
Isotyp:	Maus IgG <sub>1</sub> ,κ
Hersteller:	BD Biosciences, San José, CA, USA

#### CD133

Fluoreszenzmarkierung:	PE
Spezifität:	anti-human, Antigen CD133, Epitop 2
Herkunft:	monoklonaler Antikörper von der Maus
Klon:	293C3
Isotyp:	Maus IgG <sub>2b</sub> ,κ
Hersteller:	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

#### Maus IgG<sub>1</sub>

Fluoreszenzmarkierung:	FITC
Spezifität:	murin, IgG <sub>1</sub>
Herkunft:	monoklonaler Antikörper, Maus-Myeloma-Protein
Klon:	X40
Isotyp:	Maus IgG <sub>1</sub>
Hersteller:	BD Biosciences, San José, CA, USA

#### Maus IgG<sub>2b</sub>,κ

Fluoreszenzmarkierung:	PE
Spezifität:	murin, IgG <sub>2b</sub> ,κ
Herkunft:	monoklonaler Antikörper, Maus-Myeloma-Protein
Klon:	MPC-11
Isotyp:	Maus IgG <sub>2b</sub> ,κ
Hersteller:	BD Biosciences, San José, CA, USA

Lagerung aller verwendeten Antikörper: im Kühlschrank bei 4-6 °C und Dunkelheit.

## 4. Patientenkollektiv und Materialien

### 4.2.4 Geräte

ADVIA <sup>®</sup> Centaur <sup>®</sup> BNP-Assay	Bayer
Blutanalysegerät: Cell-Dyn <sup>®</sup> 4000	Abbott
Durchflusszytometer: FACSCalibur <sup>™</sup>	BD Biosciences
Zentrifuge: Eppendorf-Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Pipetten: 0,5 - 2,0 µl, 5 - 50 µl, 10 - 200 µl, 200 - 1000 µl	PreCision <sup>®</sup> Biozym
Analyseröhrchenständer	Nalgene
Reaktionsgefäßständer	Brand
Kühlschrank	Polar Eisfink
Stoppuhr	Huger
Müllbehälter	Arredo Plast

### 4.2.5 Software

Cell-Dyn <sup>®</sup> 4000:	
AOS (Analyzer Operating Software)	Abbott
DSOS (Data Station Operating Software)	Abbott
Sammi Grafik-Software	Kinesix Software
FACSCalibur <sup>™</sup> :	
Betriebssystem Apple 7.1	Apple Mac OS
CellQuest <sup>™</sup> -Pro (Version 5.0)	BD Biosciences
Statistik:	
Microsoft <sup>®</sup> Excel 13.0 (Version 13.0.1)	Microsoft <sup>®</sup> Corporation
SPSS 14.0S	SPSS Inc.

## **5. Methoden**

### **5.1 Herstellung von Lösungen**

#### **5.1.1 Phosphate Buffered Saline (PBS)**

PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) kann durch das Freigeben von Phosphationen kleine Schwankungen des pH-Werts einer Lösung abpuffern. Der Zellturgor bleibt dabei unverändert. Für die Herstellung von 1 L PBS wurden 5 PBS-Tabletten der Firma SIGMA-Aldrich in einem geeigneten Gefäß bis zur 1 Liter-Markierung mit Aqua ad injectabilia aufgefüllt, aufgelöst und gründlich vermischt. PBS wurde bei Raumtemperatur gelagert.

#### **5.1.2 Lyselösung**

Bei der durchflusszytometrischen Analyse von Leukozyten können Erythrozyten störend sein, da sie unspezifisch Antikörper binden und so das Ergebnis verfälschen. Zur Eliminierung der roten Blutzellen wurde Lyselösung von BD Biosciences verwendet. Diese schafft nach Angaben des Herstellers ein leicht hypotones Milieu, wodurch es zum Zusammenbrechen der Erythrozytenwandstabilität und zur Auflösung der roten Blutzellen kommt. Die Leukozyten bleiben dabei unbeschadet. Für die Herstellung von 1 L Lyselösung wurden 100 ml 10-fach konzentrierte Lysereagenz in ein geeignetes Gefäß gefüllt, mit 900 ml Aqua ad injectabilia auf einen Liter aufgefüllt und gut vermischt. Lyselösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

### **5.2 Gewinnung der Blutproben**

Jedem Patienten wurden 9 ml venöses Blut entnommen. Es wurden EDTA-beschichtete Monovetten verwendet. EDTA bildet mit den im Blut befindlichen Kalzium-Ionen, die wesentlich an der Blutgerinnung beteiligt sind, Chelatkomplexe. Auf diese Weise wird die Gerinnung des Blutes unterbunden und es verbleibt beliebig lange im flüssigen Zustand.

### 5.3 Verdünnung der Antikörper

#### 5.3.1 Anti-CD133 und Maus-IgG<sub>2b,κ</sub>

Bei den durchgeführten Messungen wurde nach den in der Promotionsarbeit von Heike Reichelt beschriebenen Methoden vorgegangen. Darin ist die optimale Verdünnung aller hier verwendeten Antikörper für die Probenpräparation (siehe unter 5.6) mit Verdünnungsreihen bestimmt worden. Es stellte sich heraus, dass bei der Verwendung von 10 µl einer Anti-CD133-Verdünnung im Verhältnis von 1:5 mit PBS eine Absättigung der CD133-Antigene auf den Oberflächenmembranen der Zellen gegeben ist. Für die Anfärbung der Zellen einer Blutprobe zur CD34/CD133-Probenanalyse wurden 8 µl Anti-CD133 mit 32 µl PBS verdünnt und jedem Reaktionsgefäß 10 µl davon zugegeben. Da zur größeren Zellausbeute im Versuchsdurchlauf von jeder Blutprobe zwei Reaktionsgefäße für die CD34/CD133-Probenanalyse vorbereitet wurden, musste von der Anti-CD133-Verdünnung die doppelte Menge hergestellt werden.

Als Isotypkontrolle-Antikörper wurde Maus-IgG<sub>2b,κ</sub> verwendet. Dieser war mit 200 µg je ml PBS etwa zwölfmal so hoch konzentriert wie Anti-CD133 mit 16,5 µg je ml PBS. Nach einer Verdünnung von 1:5 lag Anti-CD133 in einem Mischungsverhältnis von 3,3 µg je ml PBS vor. Um dieselbe Konzentration beim Isotypkontrolle-Antikörper zu erreichen, wurde Maus-IgG<sub>2b,κ</sub> im Verhältnis von 1:60 verdünnt, d.h. es wurde für eine Blutprobe 1 µl Maus-IgG<sub>2b,κ</sub> mit 59 µl PBS gemischt und davon 10 µl je Reaktionsgefäß verbraucht.

Die Verdünnung der Antikörper wurde nach einem festen Schema durchgeführt, das in Tabelle 2 dargestellt ist. Sie zeigt die in Abhängigkeit von der Probenanzahl verwendeten sowie hergestellten Gesamtmengen von 1:5 verdünntem Anti-CD133 und 1:60 verdünntem Maus-IgG<sub>2b,κ</sub>. Bei den Antikörperverdünnungen sind geringfügig größere Mengen hergestellt worden als für die Anfärbung der Zellen verwendet wurde, da auf diese Weise eine größere Genauigkeit erzielt werden konnte.

Die hergestellten Antikörperverdünnungen wurden innerhalb weniger Stunden verbraucht.



## 5. Methoden

**Tabelle 2:** Überblick über die Verdünnung von Anti-CD133 und Anti-Maus-IgG<sub>2b,κ</sub>.

Mengenangaben am Beispiel von 1, 2 und 3 Patientenblutproben mit Gegenüberstellung der verwendeten und hergestellten Verdünnungen sowie den dazu benötigten Antikörpern und PBS. (Einheit: alle in µl)

Antikörperverdünnungen	Anzahl der Blutproben		
	1	2	3
<b>Anti-CD133</b>			
<u>verwendete</u> Menge	20	40	60
<u>hergestellte</u> Menge	40	60	80
- Anti-CD133	8	12	16
- PBS	32	48	64
<b>Maus-IgG<sub>2b,κ</sub></b>			
<u>verwendete</u> Menge	20	40	60
<u>hergestellte</u> Menge	60	60	120
- Maus-IgG <sub>2b,κ</sub>	1	1	2
- PBS	59	59	118

### 5.3.2 Anti-CD34 und Maus-IgG<sub>1</sub>

Bei den in der Promotionsarbeit von Heike Reichelt durchgeführten Verdünnungsreihen stellte sich heraus, dass die Verwendung von 10 µl des Anti-CD34 für eine Absättigung der CD34-Epitope von den in der beschriebenen Probenpräparation (siehe unter 5.6) isolierten Zellen ausreichend sind. Dasselbe gilt für den Isotypkontrolle-Antikörper Maus-IgG<sub>1</sub>. Diese beiden Antikörper wurden daher unverdünnt eingesetzt und im Versuchsdurchlauf in einer Dosierung von 10 µl je Reaktionsgefäß verwendet.

### 5.4 Erstellung der Differentialblutbilder

#### 5.4.1 Blutanalysegerät Cell-Dyn<sup>®</sup> 4000

Die Blutanalyse wurde am Cell-Dyn<sup>®</sup> 4000, siehe Abbildung 3, in der Blutbank des Instituts für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums der FSU Jena durchgeführt. Die verwendeten Betriebssysteme waren AOS (Analyzer Operating Software) für die Analyseeinheit und DSOS (Data Station Operating Software) für die Datenstation des Cell-Dyn<sup>®</sup> 4000. Als Grafik-Software war Sammi von Kinesix-Software installiert.



**Abbildung 3:** Cell-Dyn<sup>®</sup> 4000 Blutanalysegerät der Firma Abbott Laboratories.  
(Diamond diagnostics 2007)

#### 5.4.2 Funktions- und Messprinzip des Cell-Dyn<sup>®</sup> 4000

Das Cell-Dyn<sup>®</sup> 4000 Blutanalysegerät erstellt maschinelle Differentialblutbilder. Die folgenden Ausführungen beschränken sich auf die Leukozyten und deren Subpopulationen. Cell-Dyn<sup>®</sup> 4000 besteht aus einer Analyseneinheit, einer pneumatischen Einheit und einer Datenstation. Die Analyseneinheit dient zum Ansaugen, Verdünnen und zur Analyse der Probenflüssigkeit. Die pneumatische Einheit ermöglicht über Druck und Vakuum den automatischen Probentransport. Die Datenstation empfängt, digitalisiert und verarbeitet die Ergebnisse. Für die Messung aus „offenen Röhrchen“ ist ein Probenvolumen von mindestens 150 µl notwendig. Der Ansaugvorgang wird durch einen kurzen Druckimpuls auf die Spitze der Ansaugnadel gestartet. Von der Probenansaugpumpe werden bei jeder Messung über die Nadel 112,5 µl Blut aus dem Röhrchen aspiriert. Danach wird die Nadel automatisch zu den Verdünnungsgefäßen geführt, in welche, von der Ansaugpumpe gesteuert, nacheinander

## 5. Methoden

definierte Blutmengen abgegeben werden. Das mittlere Verdünnungsgefäß dient im weiteren Verlauf der Leukozytenbestimmung. In dieses wird ein Probenvolumen von 37,5 µl gespritzt, das anschließend mit 1,16 ml WBC-Reagenz Teil A und 0,12 ml WBC-Reagenz Teil B im Verhältnis von 1:35 verdünnt wird. Neben Probenverdünnung und Erhaltung der Leukozytenvitalität dient diese Reagenzienmischung der Erythrozytenlyse und der Schnellanfärbung von Normoblasten (kernhaltige Erythrozytenvorstufen) sowie Leukozyten mit Zellwanddefekten. Als Fluoreszenzfarbstoff dient Propidiumjodid, das nach Anregung mit Laserlicht von  $\lambda = 488 \text{ nm}$  rotes Licht um  $\lambda = 630 \text{ nm}$  abstrahlt. Die Probenverdünnung wird anschließend in die optische Durchflussküvette transportiert, worin zeitgesteuert die Messungen erfolgen. Dabei bewegt sich die Probenflüssigkeit als axialer, laminarer Strom und wird von einer Mantelflüssigkeit (Sheath-Reagenz) umhüllt. Dies ermöglicht die Zuleitung der Leukozyten in einer Reihe, so dass jede Zelle einzeln auf Fluoreszenzen untersucht werden kann. Die Messung der Zellzahl basiert auf dem Widerstandsmessprinzip. Dabei wird der Stromfluss zwischen zwei sich gegenüberliegenden Elektroden durch den Widerstand der Zellmembran beim Passieren unterbrochen. Das erzeugt einen elektrischen Impuls, dessen Amplitude dem Zellvolumen proportional ist. Dadurch können die Leukozytensubpopulationen voneinander unterschieden und ihre Anzahl separat erfasst werden. Die weitere Differenzierung der Leukozyten erfolgt nach dem Prinzip der Durchflusszytometrie mit einem Argon-Ionen-Laser. Damit werden zum einen die Zellgröße und die Granularität der Zellen ermittelt und zum anderen durch Messung der Lichtemission des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes Propidiumjodid im roten Bereich die vitalen Zellen von Normoblasten und nekrotischen Zellen abgegrenzt. Im Gerät sind verschiedene Detektoren in unterschiedlichen Winkeln lokalisiert, die bei einer Messung insgesamt fünf Signale erfassen: das  $0^\circ$ -Absorptionssignal (Zellgröße), das  $7^\circ$ -Vorwärtsstreulicht (Zellstruktur), das  $90^\circ$ -Streulicht (Zellgranularität), das depolarisierte  $90^\circ$ -Streulicht (um  $90^\circ$  gedrehte Polarisationsebene des Streulichts gegenüber der Messstrahlung beim Bestrahlen von eosinophilen Granulozyten) und die Rotfluoreszenzstrahlung (nekrotische Zellen und Normoblasten binden das Fluorochrom Propidiumjodid, das im roten Wellenlängenbereich um  $\lambda = 650 \text{ nm}$  emittiert). Die gemessenen Signale verhalten sich proportional zur Lichtintensität. Sie müssen einen definierten Schwellenwert (Threshold) überschreiten, damit das Partikel als Blutzelle erkannt wird. Die Lichtsignale werden von den Detektoren als Spannungspulse erfasst und zu den Photomultiplern der Datenstation weitergeleitet. Alle Gerätekomponenten, die mit der Probenlösung in Kontakt kommen, werden nach den durchgeführten Messungen vollautomatisch mit Sheath-Reagenz gespült und benetzt.

## 5. Methoden

### 5.4.3 Einstellungen am Cell-Dyn<sup>®</sup> 4000

Vor jeder Messung wurden am Cell-Dyn<sup>®</sup> 4000 die Einstellungen zur Erstellung eines Differentialblutbildes aus offenen Röhrchen vorgenommen. Dazu wurde im Hauptmenü der Ergebnisdatei unter „Probenlauf offener Röhrchen“ der Probentyp „Patient“, die Testauswahl „Blutbild“, das Parameterprofil „Spender“ und der Grenzwertbereich „Spender“ ausgewählt.

### 5.4.4 Arbeitsschritte am Cell-Dyn<sup>®</sup> 4000

Zur Erstellung des Differentialblutbildes wurden am Cell-Dyn<sup>®</sup> 4000 die entsprechenden Einstellungen (siehe unter 3.4.3) vorgenommen und die mit 9 ml Patientenblut gefüllten EDTA-Monovette zur Messung vorbereitet. Dazu wurde sie auf Raumtemperatur gebracht und das Vollblut durch ca. 20-maliges Umdrehen manuell gemischt. Anschließend wurde die Ansaugnadel bis zum Boden in das Röhrchen eingetaucht. Im Gerätemodus „ready“ (einsatzbereit) wurde zum Start des Ansaugvorgangs die Ansaugnadel des Cell-Dyn<sup>®</sup> 4000 mit dem Boden der Monovette durch einen kurzen Impuls etwas nach oben gedrückt. Daraufhin wechselte der Arbeitsstatus von „ready“ auf „busy“ (beschäftigt) und „aspirating“ (ansaugend). Während des Ansaugens wurde darauf geachtet, dass ein geringer Abstand zwischen der Kanüle und dem Boden des Röhrchens gehalten wurde. Es wurde eine definierte Menge von 112,5 µl Blut durch das Gerät aspiriert. Nach Beendigung des Ansaugvorgangs wurde die Nadel selbstständig vom Gerät zurückgezogen und gereinigt. Die Probe wurde automatisch weiter verarbeitet (siehe unter 5.4.2). Nach etwa 38 Sekunden hatte das Gerät die Messungen beendet und alle kontaminierten Komponenten des Systems mit Sheath Reagenz selbstständig gespült. Diese Schritte wurden zweimal wiederholt, so dass von jeder Blutprobe insgesamt drei Differentialblutbilder entstanden. Dabei wurden insgesamt 337,5 µl Vollblut verbraucht. Die Ergebnisse wurden anschließend ausgedruckt.

## 5. Methoden

### 5.5 Durchflusszytometrie

#### 5.5.1 Durchflusszytometer FACSCalibur™

Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten am FACSCalibur™-Durchflusszytometer der Firma BD Biosciences, siehe Abbildung 4, im transplantationsimmunologischen Labor des Instituts für Transfusionsmedizin im Universitätsklinikum der FSU Jena. Als Software wurde CellQuest™-Pro der Firma BD Biosciences verwendet.



**Abbildung 4:** FACSCalibur™ Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson Biosciences.  
(Cell and Molecular Imaging Center 2006)

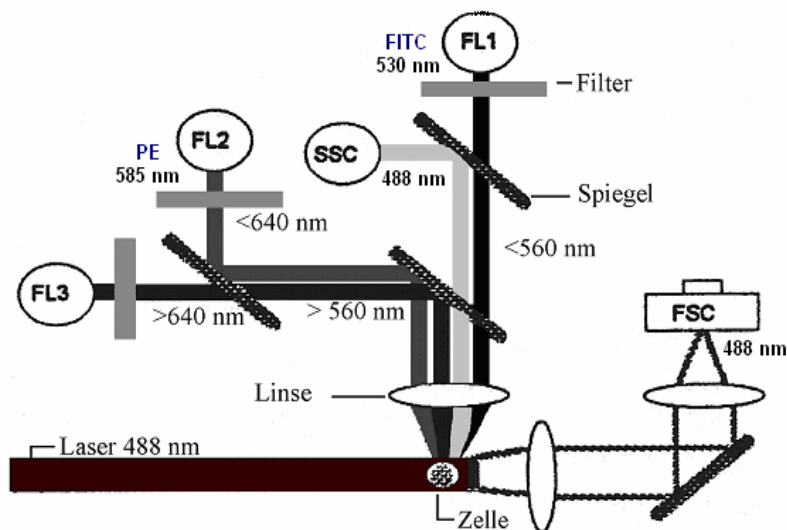
#### 5.5.2 Funktions- und Messprinzip des FACSCalibur™

Das FACSCalibur™-Durchflusszytometer kann Blutzellen auf Grund der unterschiedliche Zellgröße und Zellgranularität differenzieren. Darüber hinaus kann dieses Analysegerät die Expression von Oberflächenmolekülen auf Zellen detektieren, wenn diese zuvor mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt worden sind.

Das Gerät besteht aus drei kombinierten Systemen, die den Probenfluss, die Laserlichtanregung und Detektion sowie die Umwandlung der optischen in elektronische Signale steuern. Der Ansaugvorgang der Probenflüssigkeit wird durch das Eintauchen der Messnadel in das Analyseröhrchen und anschließendes Umlegen des Messfußes gestartet. Die Probenflüssigkeit gelangt durch Druck in laminarer Strömung mit einer sie ummantelnden Trägerflüssigkeit (FACS Flow™) in die Messküvette. Darin fließen die Zellen der Reihe nach an einem quer zur Fließrichtung ausgerichteten Laserlichtstrahl vorbei. Das verwendete FACSCalibur™-Durchflusszytometer ist mit einem luftgekühlten blauen Argon-Ionen-Laser

## 5. Methoden

ausgestattet, welcher Licht einer Wellenlänge von  $\lambda = 488 \text{ nm}$  abstrahlt. Dieses Laserlicht wird zum einen von den Zellen gebrochen, zum anderen regt es die an die Zellen gebundenen Fluoreszenzpartikel zur Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge an. Das Licht wird über ein System aus Linsen und Spiegeln den in unterschiedlichen Winkeln lokalisierten Detektoren zugeleitet. Jeder Detektor empfängt ein anderes Signal. In Abbildung 5 ist die Detektorausrichtung in der Messkammer schematisch dargestellt.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Messkammer des FACSCalibur<sup>TM</sup>-Durchflusszytometers.

Laser: Argon-Ionen-Laser (488 nm Blue Laser), Detektoren: FSC: Forward Scatter, SSC: Sideward Scatter, FL1: Fluoreszenz 1 = FITC, FL2: Fluoreszenz 2 = PE, FL3: Fluoreszenz 3.

(modifiziert nach der Bedienungsanleitung des FACSCalibur<sup>TM</sup>-Durchflusszytometers der Firma BD)

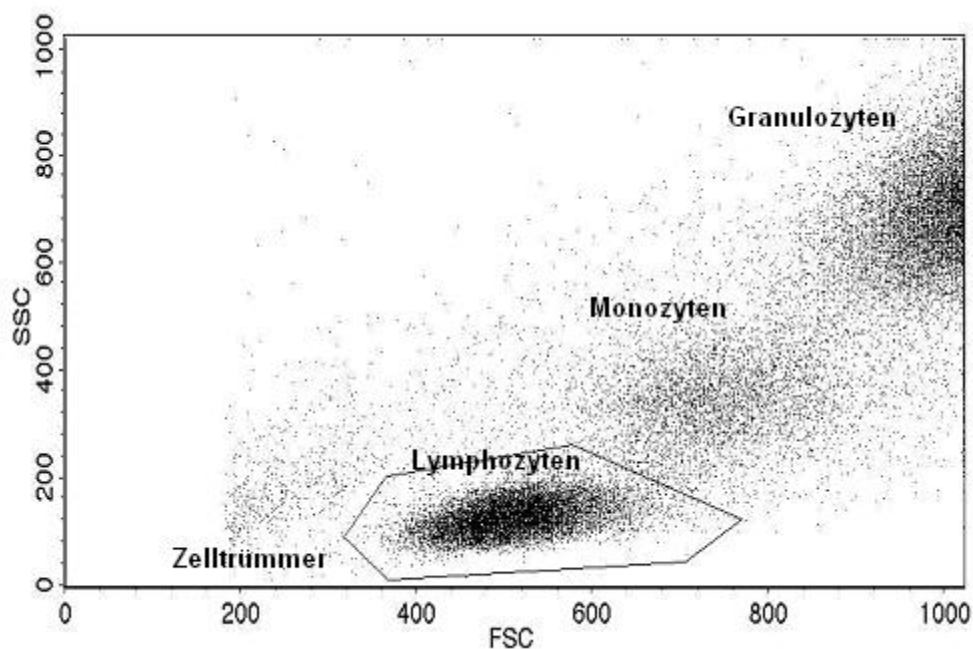
Der FSC-Detektor erfasst die Vorwärtsstreuung (Forward Scatter), eine durch den Zelldurchmesser bedingte Lichtbeugung entlang des Laserlichtstrahls ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ). FSC lässt Rückschlüsse auf die relative Zellgröße zu. Je größer die Zelle ist, desto höher ist die Lichtbeugung in Richtung von FSC. Der Zusammenhang ist proportional.

Der SSC-Detektor erfasst die Seitwärtsstreuung (Sideward Scatter), eine durch die Zellbestandteile hervorgerufene Lichtbrechung und Reflexion im 90°-Winkel zum einfallenden Laserlichtstrahl. Das von den Zellgranula gebrochene Laserlicht ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) wird von einer Linse gesammelt und anschließend über einen Spiegel zum SSC-Detektor geleitet. SSC gibt die relative Granularität der Zellen wieder. Je mehr Strukturen sich in einer

## 5. Methoden

Zelle befinden, desto größer ist die Lichtbrechung und desto mehr weicht die Streustrahlung vom rechten Winkel des Laserlichtstrahls ab. Der Zusammenhang ist proportional.

In Abbildung 6 ist das Größen-Granularitäts-Verhältnis der Leukozytensubpopulationen im SSC-FSC-Dotplot dargestellt. Die Achsen geben die gemessenen Lichtintensitäten und damit die Größe (FSC-Achse) und die Granularität (SSC-Achse) der Zellen wieder. Um die Lymphozytenpopulation herum ist ein Analysefenster (Gate) gezeichnet. Sie sind kleiner als die Granulozyten, welche als größte und granulierte Gruppe der Leukozyten am weitesten peripher liegen. Die Zwischenstellung zwischen Granulozyten und Lymphozyten nehmen die Monozyten ein. Vorhandene Zelltrümmer und nekrotische Zellen sind klein und ungranuliert.



**Abbildung 6:** Exemplarische Darstellung der Leukozytensubpopulationen im SSC-FSC-Dotplot.

FSC: Forward Scatter, SSC: Sideward Scatter, Analysefenster (Gate) um die Lymphozyten gezeichnet.

Die Fluoreszenz-Detektoren empfangen emittiertes Licht. Dieses stammt von den Fluorochromen, die zuvor über die Antikörper spezifisch an die Zellen gebunden haben und in der Messkammer vom Laserlichtstrahl zur Emission angeregt wurden. Dabei absorbieren die Fluorochrome die Energie des Laserlichts ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) und strahlen es mit höherer Wellenlänge wieder ab. Die Wellenlängendifferenz zwischen absorbiertem und emittiertem Licht wird als „Stoke’s Shift“ bezeichnet. Je mehr fluorochrommarkierte Antikörper an die

## 5. Methoden

Zelle gebunden haben, desto stärker ist das von ihr ausgehende Gesamtsignal. Es wurden Fluorochrome verwendet, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren. Dadurch können sie voneinander unterschieden werden. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) emittiert grünes Licht um  $\lambda = 530$  nm, Phycoerythrin (PE) dagegen gelbrotes Licht um  $\lambda = 585$  nm. Der FL1-Detektor empfängt Licht mit Wellenlängen von weniger als 560 nm und detektiert damit Wellenlängen von  $\lambda = 530 \pm 30$  nm. Er erfasst somit die von FITC abgestrahlte Fluoreszenz. Dem FL2-Detektor wird durch zwei Spiegel Licht mit Wellenlängen zwischen 560 und 640 nm zugeleitet. Er detektiert Wellenlängen um  $\lambda = 585 \pm 42$  nm und damit das von PE emittierte Licht. Auf den Fluoreszenzdetektor für FL3 wird in diesen Ausführungen nicht eingegangen, da er in der Arbeit nicht verwendet worden ist. Die Detektoren wandeln die eingehenden Lichtsignale in elektrische Signale um. Diese werden anschließend zur Datenstation weitergeleitet, wo sie der Auswertung zur Verfügung stehen.

### 5.5.3 Einstellungen am FACSCalibur™

Detektoren/Verstärker (Detectors/Amps):

In Tabelle 3 sind die Einstellungen an den Fluoreszenzdetektoren des FACSCalibur™-Durchflusszytometers zusammengefasst. Sie wurden bei allen durchflusszytometrischen Messungen der durchgeführten Arbeit beibehalten.

Schwellenwert (Threshold):

Damit vom Durchflusszytometer Lymphozyten und Stammzellen erkannt werden können, muss das durch diese Zellen abgegebene Signal einen festgelegten Schwellenwert in einem festgelegten Detektor (Kanal) überschreiten. Bei der Lymphozytenmessung wurde der Schwellenwertparameter im FSC-Detektor wie folgt definiert und für alle durchgeführten Messungen beibehalten: Primary Parameter: FSC, Value: 179, Secondary Parameter: none.

Kompensation:

Da sich die Emissionsbereiche von FITC- und PE-Signalen überschneiden, kommt es zu einer spektralen Fluoreszenzüberstrahlung. Dabei empfangen beide Detektoren auch Signale der anderen Fluoreszenz, wodurch sich falsch positive Messwerte ergeben. Daher wurde der die FL-2 überstrahlende Bereich der FL-1 vom FL-2-Detektor subtrahiert und umgekehrt. Die Einstellungen wurden bei allen Messungen beibehalten: FL1 – 0,8 % FL2, FL2 – 25,6 % FL1.



## 5. Methoden

**Tabelle 3:** Einstellungen an den Fluoreszenzdetektoren des FACSCalibur™-Durchflusszytometers.

Parameter	Detector (Kanal)	Voltage (Vorverstärker)	AmpGain (Verstärker)	Mode (Datenmodus)
P1	FSC	E00	2.98	Lin
P2	SSC	381	2.00	Lin
P3	FL1	520	1.00	Log
P4	FL2	578	1.00	Log

### 5.6 Arbeitsschritte zur Probenpräparation

#### 5.6.1 Vorbereitungen

Für das Anfärben der Blutzellen mit den Antikörpern Anti-CD34 und Anti-CD133 wurden zu Beginn des Versuchsdurchlaufs fünf Reaktionsgefäße mit je 300 µl Blut gefüllt. War die durchschnittliche Lymphozytenzahl der Blutprobe laut Differentialblutbildern niedriger als  $0,6 \cdot 10^9/L$ , so wurde zur Erhöhung der Zellausbeute die doppelte Menge Probenlösung und doppelt so viel Antikörperversdünndung hergestellt. Außerdem wurden drei Reaktionsgefäße für die Isotypkontrolle (siehe unter 5.6.5) und eins für die Negativkontrolle (siehe unter 5.6.6) vorbereitet und ebenfalls mit je 300 µl Blut gefüllt.

#### 5.6.2 Lysierung der Erythrozyten

In jedes Reaktionsgefäß wurden 300 µl Patientenblut aus der EDTA-Monovette pipettiert. Anschließend wurde Lyselösung bis zu der 1,5 ml-Markierung der Reaktionsgefäße aufgefüllt. Die Suspension aus Blut und Lyselösung wurde mit der 1 ml-Pipette gründlich vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 11 Minuten wurden die Proben 10 Minuten lang mit 2200 Umdrehungen pro Minute und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der entstandene Überstand über dem Sediment mit der Pipette vorsichtig abgenommen und der Lysevorgang einmal mit einer Inkubationszeit von 10 Minuten wiederholt. Dann wurde wiederholt 10 Minuten lang mit 2200 Umdrehungen pro Minute und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Lyse der Erythrozyten wurde der Überstand abgenommen und in jedes

## 5. Methoden

Reaktionsgefäß 500 µl PBS pipettiert. Das Zellsediment wurde gut mit dem zugegebenen PBS vermischt. Anschließend folgte das Konzentrieren der Probenflüssigkeiten. Dazu wurden die Zellsuspensionen aus den fünf Reaktionsgefäßen mit je 500 µl PBS aufgefüllt und gemischt. Sie wurden auf zwei neue Reaktionsgefäße aufgeteilt und bis zur 1,5 ml-Markierung mit PBS aufgefüllt. Es folgte 10-minütiges Zentrifugieren mit 2200 Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur. Danach wurden die Überstände aus den zwei Reaktionsgefäßen abpipettiert.

### 5.6.3 Blockierung der Fc-Rezeptoren

#### 5.6.3.1 Immunologische Grundlagen

Die Form eines monomeren Antikörpers ähnelt dem lateinischen Buchstaben „Y“. Er weist drei so genannte „Arme“ auf. Die zwei kurzen Arme (Fab-Arme) sind identisch aufgebaut. Sie bestehen jeweils aus einer schweren und einer leichten Kette. Die an ihren freien Enden lokalisierten variablen Regionen sind je nach Antikörpertyp mit unterschiedlichen Aminosäurefolgen ausgestattet (Paratop), deren Bildung durch das entsprechende Antigen zuvor induziert worden ist. Paratope besitzen eine hohe Affinität zu den antigenen Epitopen, wodurch eine feste Bindung zum so genannten Antigen-Antikörper-Komplex erfolgt. Durch vielfältige Kombinationsmöglichkeiten der Aminosäuren in den variablen Regionen entsteht eine große Antikörpervielfalt mit hoher Antigenspezifität. Der lange Arm der Antikörper (Fc-Arm) besteht aus zwei schweren Ketten mit konstanten Enden. Einige Blutzellen, besonders aus der weißen Zellreihe, können Fc-Rezeptoren für IgG exprimieren. Bindungen zwischen dem Fc-Arm von Maus-IgG-Antikörpern und den Fc-Rezeptorbindungsstellen solcher Zellen sind unspezifisch. Um solche unspezifischen Bindungen zu verhindern, müssen die Fc-Rezeptoren mit spezifischem, unmarkiertem humanem IgG abgesättigt werden. Dazu wurde Fc-Blocking-Reagenz verwendet.

#### 5.6.3.2 Absättigung der Fc-Rezeptoren mit Fc-Blocking Reagenz

In jedes Reaktionsgefäß wurden 20 µl Fc-Blocking Reagenz sowie 80 µl PBS gegeben und mit den Zellen gut vermischt. Es folgte eine 8-minütige Inkubation im Kühlschrank bei 4 bis 6 °C und Dunkelheit. Daraufhin wurde jedem Reaktionsgefäß 1 ml PBS zugegeben, wiederholt gründlich mit dem Inhalt aufsuspensiert und 10 Minuten lang mit 2200

## 5. Methoden

Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und die Zellen mit PBS gewaschen, um überschüssige Fc-Blocking Reagenz zu entfernen. Dazu wurde jedes der Reaktionsgefäße mit 500 µl PBS versehen, gut mit dem Sediment vermischt und anschließend 10 Minuten lang mit 2200 Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde einmal wie beschrieben wiederholt und die Überstände aus den Reaktionsgefäßen abgenommen.

### 5.6.4 Anfärbung der Zellen mit Anti-CD34 und Anti-CD133

Die zwei Reaktionsgefäße für die CD34/CD133-Probenanalyse wurden jeweils mit 10 µl des unverdünnten Anti-CD34 sowie 10 µl des 1:5 verdünnten Anti-CD133 versetzt und gut mit den Zellen aufsuspensiert. Es folgte eine Inkubation über 12 Minuten bei 4-6 °C und Dunkelheit im Kühlschrank. Während dieser Zeit wurde die Zentrifuge auf 2 °C gekühlt. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße mit 1 ml PBS gefüllt 10 Minuten lang mit 2200 Umdrehungen pro Minute bei 2 °C zentrifugiert. Es folgten zwei Waschvorgänge, bei denen die Überstände abgenommen, jedem Reaktionsgefäß 500 µl PBS zugegeben und die Zellen darin gut aufsuspensiert wurden. Anschließend wurde 10 Minuten lang mit 2200 Umdrehungen pro Minute und Raumtemperatur zentrifugiert und die Überstände abpipettiert.

### 5.6.5 Durchführung der Isotypkontrolle

Die Durchführung der Isotypkontrolle erfolgte immer parallel zum Anfärben der Zellen mit Anti-CD34 und Anti-CD133. Unterschiede bestanden in den folgenden Punkten:

1. Für die Isotypkontrolle wurden im Versuchsdurchlauf drei Reaktionsgefäße verwendet. In jedes davon wurden zu Beginn der Probenpräparation je 300 µl Blut pipettiert.
2. Zum Konzentrieren der Zellen nach der Erythrozytenlyse wurden die drei Reaktionsgefäße mit je 500 µl PBS aufgefüllt und die Zellen darin gut aufsuspensiert. Anschließend wurden sie in einem neuen Reaktionsgefäß zu insgesamt 1,5 ml zusammengeführt.
3. Beim Anfärben der Leukozyten mit Antikörpern wurden jeweils 10 µl unverdünntes Maus-IgG<sub>1</sub>- FITC und 10 µl des 1:60 verdünnten Maus-IgG<sub>2b</sub>,κ-PE verwendet.

## 5. Methoden

### 5.6.6 Durchführung der Negativkontrolle

Bei jedem Versuchsdurchlauf wurde außerdem parallel immer eine Negativkontrolle, ein Ansatz ohne Antikörper, mitgeführt. Dabei gab es die folgenden Abweichungen:

1. Für die Negativkontrolle wurde im Versuchsdurchlauf ein Reaktionsgefäß verwendet. Dahinein wurden zu Beginn wie in alle anderen Reaktionsgefäße 300 µl Blut gefüllt.
2. Nach der Erythrozytenlyse wurden die verbleibenden Zellen bis zur 1,5 ml-Markierung mit PBS aufgefüllt und gut darin aufsuspensiert.
3. Die Negativkontrolle wurde nicht mit Antikörpern angefärbt. Während des Anfärbens der anderen Proben wurde die Negativkontrolle verschlossen bei 4-6 °C und Dunkelheit im Kühlschrank aufbewahrt. Ab der nächsten Zugabe von PBS im Versuchsdurchlauf wurde sie wieder mitgeführt.

### 5.7 Arbeitsschritte zur durchflusszytometrischen Probenanalyse

Die Zellsuspensionen aus den für die CD34/CD133-Probenanalyse vorbereiteten Reaktionsgefäßen wurden vor der Analyse zusammengeführt. Dazu wurde das Sediment des einen Reaktionsgefäßes mit der Pipette in 500 µl PBS aufsuspensiert und in das zweite Reaktionsgefäß übertragen. Darin wurden die Zellen wiederholt gut aufgemischt und anschließend in ein Analyseröhrchen pipettiert. Die Sedimente in den Reaktionsgefäßen der Isotyp- und Negativkontrollen wurden jeweils mit 500 µl PBS aufsuspensiert und anschließend mit der Pipette in ein Analyseröhrchen übertragen.

Vor Beginn der Messungen der vorbereiteten Analyseröhrchen wurde das FACSCalibur™-Durchflusszytometer am Netzschalter eingeschaltet und der Probendruckregler aktiviert. Anschließend wurde im Programm CellQuest™-Pro die für die Messungen notwendigen Einstellungen (siehe unter 5.5.3) vorgenommen. Die Messungen am Durchflusszytometer erfolgten mit der Flussgeschwindigkeit „medium“ (Durchfluss von ~35 µl Probenlösung/Minute). Das Analyseröhrchen wurde auf die Messnadel geschoben und der Messfuß unter dem Röhrchen umgeschlagen, so dass der Gerätemodus auf „run“ wechselte und der Ansaugvorgang startete. Zuerst wurden in der Negativkontrolle insgesamt 100.000 aus der Gesamtheit aller detektierten Zellen ausgezählt. Dabei wurden die Leukozyten in CellQuest™-Pro als Punktwolke (Dotplot) in FSC-SSC-Ansicht dargestellt, worin FSC mit

## 5. Methoden

der Größe und SSC mit der Granularität der untersuchten Zellen wachsen. In diesem Dotplot wurde ein Analysefenster (Gate) um die Lymphozytenpopulation gesetzt (siehe Abbildung 6). Darin erfolgten anschließend die Fluoreszenzmessungen der markierten Zellen.

Für die Messung der CD34/CD133-markierten Probe wurden die Einstellungen auf das Auszählen von 200.000 Zellen im gesetzten Gate geändert (Gated Events: 200.000). Dabei wurden die im Wellenlängenbereich von FITC und PE fluoreszierenden Zellen gezählt und anschließend zweidimensional im FL1-FL2-Dotplot gegeneinander aufgetragen. Die emittierte Fluoreszenz des FITC-gekoppelten Antikörpers CD34 wurde als Fluoreszenz 1 (FL1) definiert und auf der x-Achse aufgetragen. CD133 war PE-gebunden und als Fluoreszenz 2 (FL2) auf der y-Achse abzulesen. Zu jeder Messung wurde mit CellQuest<sup>TM</sup>-Pro eine Quadrantenstatistik erstellt. Dazu wurde im FL1-FL2-Dotplot ein Fadenkreuz auf die 10<sup>1</sup>-Markierung (Skalierung logarithmisch) der x- sowie der y-Achse gelegt, wodurch jeder Dotplot in die vier Quadranten UR (Upper Right), UL (Upper Left), LR (Lower Right) und LL (Lower Left) unterteilt worden ist. UR beinhaltet die Population der doppeltpositiven Zellen, welche sowohl mit Anti-CD34-FITC als auch mit Anti-CD133-PE markiert sind (→UR: CD34+/CD133+ Zellen). UL enthält alle diejenigen Zellen, die nur positiv für CD133 sind (→UL: CD133+/CD34– Zellen), LR dagegen solche Zellen, die nur Anti-CD34-FITC gebunden haben (→LR: CD34+/CD133– Zellen). LL umfasst alle unmarkierten Zellen, die keine Fluoreszenzen in den untersuchten Spektren emittieren (→LL: CD34–/CD133– Zellen). Die Proben der Isotyp- sowie Negativkontrollen wurden wie beschrieben ausgewertet, mit dem Unterschied, dass 20.000 Zellen im gesetzten Lymphozyten-Gate ausgezählt wurden (Gated Events: 20.000). Detektierte Fluoreszenzen in der Isotypkontrolle sind ein Zeichen für unspezifische Antikörperbindungen oder Autofluoreszenzen. Sie lassen das Messergebnis fälschlicherweise zu hoch erscheinen und wurden bei jeder Messung kontrolliert. Als Isotypkontrolle-Antikörper wurden Anti-Maus-IgG<sub>1</sub>-FITC (FL1) und Anti-Maus-IgG<sub>2b,k</sub>-PE (FL2) verwendet. Die Negativkontrolle wurde nicht mit Antikörpern versetzt. Detektierte Fluoreszenzen außerhalb des Quadranten LL lassen hier auf Verunreinigungen der verwendeten Chemikalien und Materialien schließen und wurden kontrolliert.

Am Ende jeder Messung erfolgte die Reinigung aller mit Probenflüssigkeit kontaminierten Komponenten des Durchflusszytometers mit Desinfektionslösung (FACS Safe<sup>TM</sup>) und Reinigungslösung (FACS Rinse<sup>TM</sup>) nacheinander im Arbeitsmodus „run“ und mit der Durchflussgeschwindigkeit „high“ (Durchfluss von ~60 µl Probenlösung/Minute) jeweils eine Minute ohne und vier Minuten lang mit unter das Analyseröhrchen geklapptem Messfuß.

## 5.8 Berechnung der Anzahl der im Blut zirkulierenden Zellen

### 5.8.1 Anzahl der Lymphozyten

Da die Anzahl von CD34+/CD133+ primitiven Stammzellen aus der Lymphozytenpopulation gemessen wurde, musste die durchschnittliche Anzahl der Lymphozyten im Blut aus dem Differentialblutbild für die Berechnungen herangezogen werden. Je Patient wurden drei Differentialblutbilder erstellt. Die gemessenen Lymphozytenzahlen ( $x_1$ ,  $x_2$  und  $x_3$ ) wurden, wie in Formel I ersichtlich, miteinander addiert und anschließend durch 3 geteilt. Das Ergebnis gibt die durchschnittliche Lymphozytenzahl ( $LYM_0$ ) je Liter Blut wider. Es wurde in der S.I.-Einheit  $10^9/L$  angegeben.

#### Formel I:

$$\begin{array}{c} \text{LYM}_0 \\ * 10^9 \text{ je} \\ \text{Liter Blut} \end{array} = \frac{\begin{array}{c} x_1 + x_2 + x_3 \\ (= \text{Lymphozytenzahlen aus} \\ \text{den Differentialblutbildern}) \end{array} * \begin{array}{c} 10^9 \text{ je Liter Blut} \\ (\text{S.I.-Einheit der} \\ \text{Lymphozytenzahl im Blut}) \end{array}}{\begin{array}{c} 3 \\ (= \text{Anzahl der Messungen}) \end{array}}$$

### 5.8.2 Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen

Mit der Durchflusszytometrie können keine Absolutwerte bestimmt werden, sondern nur relative Anteile an einer vom Benutzer festgelegten Gesamtzellzahl (Gated Events). Daher musste die absolute Anzahl der in einem Liter Blut zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen mathematisch berechnet werden. Dazu wurde die Formel II verwendet. Benötigt wurde die durchflusszytometrisch ermittelte Zahl doppeltfluoreszierender CD34+/CD133+ Zellen (UR) sowie die Gesamtzahl der ausgezählten Zellen (Gated Events) aus der Quadrantenstatistik sowie die durchschnittliche Lymphozytenzahl je Liter Blut ( $LYM_0$ ) aus Formel I. Mit dem Dreisatz in Formel II wurde von der Zahl der doppeltmarkierten Zellen je Gated Events auf die Anzahl der CD34+/CD133+ Stammzellen je Lymphozyten pro Liter Blut geschlossen.

## 5. Methoden

### Formel II:

<b>Anzahl der CD34+/ CD133+ Stammzellen je Liter Blut</b>	<b>UR</b> aus der Quadrantenstatistik (= Anzahl doppelt- fluoreszierender Zellen CD34+/CD133+)	*	<b>LYM<sub>Ø</sub></b> (= durchschnittliche Lymphozytenzahl je Liter Blut aus Formel I)	*	<b>10<sup>9</sup> je Liter Blut</b> (= S.I.-Einheit der Lymphozytenzahl im Blut)
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 10px;"> <b>Gated Events</b> aus der Quadrantenstatistik (= Gesamtanzahl der ausgezählten Ereignisse im gesetzten Analysefenster)         </div>					

### 5.8.3 Berechnung der Anzahl der CD34+/CD133+ Stammzellen an einem Beispiel

Aus dem Differentialblutbild werden die drei ermittelten Zahlenwerte der Lymphozyten im Patientenblut abgelesen, miteinander addiert und anschließend durch ihre Anzahl geteilt. In Abbildung 7 ist ein Auszug aus einem Differentialblutbild dargestellt. Die LYM-Werte sind markiert. Sie betragen  $x_1 = 2,78$ ,  $x_2 = 2,78$ ,  $x_3 = 2,71$ . Alle Angaben in S.I.-Einheit ( $10^9/L$ ).

Anwendung von Formel I (siehe unter 5.8.1):

$$(x_1 + x_2 + x_3) : 3 = (2,78 + 2,78 + 2,71) : 3 = \underline{2,76} \text{ LYM}_\emptyset * 10^9/L$$

Das Ergebnis gibt die durchschnittliche Lymphozytenzahl ( $\text{LYM}_\emptyset$ ) \*  $10^9$  je Liter Blut an.

Seq#	Proben-ID	NEU	LYM	MONO	EOS	BASO
1778	AutoBkgd					
1779	AutoBkgd					
1780	1	5.65	2.78	.997	.143	.068
1781	1	5.45	2.78	.884	.137	.011
1782	1	5.47	2.71	1.00	.137	.015

**Abbildung 7:** Exemplarischer Auszug der Differentialblutbilder einer Blutprobe des Datensatzes.

Seq#: fortlaufende Messnummer am Cell-Dyn® 4000, AutoBkgd: automatischer Spülvorgang, 1: Beispiel für Proben-ID, NEU: neutrophile, LYM: Lymphozyten (S.I.-Einheit:  $10^9/L$ ), MONO: Monozyten, EOS: eosinophile Granulozyten, BASO: basophile Granulozyten. Die LYM-Werte der Probe 1 sind umrahmt.

## 5. Methoden

In jeder Patientenblutprobe wurden die doppeltfluoreszierenden Zellen (CD34+/CD133+) anteilmäßig an den ausgezählten Ereignissen im Analysefenster (Gated Events) = 200.000 quantitativ erfasst. Diesem Wert entsprachen im Beispiel UR = 40 Ereignisse, in dem oberen rechten Quadranten der FL1-FL2-Punktewolke (Dotplot) mit eingezeichnetem Quadrantenmarker. Sowohl die Gated Events als auch der Wert von UR wurden aus der Quadrantenstatistik abgelesen. In Abbildung 8 ist solch eine Quadrantenstatistik dargestellt. Die UR- sowie Gated Events-Werte sind darin markiert.

Quadrant Statistics							
File:				Log Data Units: Linear Values			
Sample ID: Patient1 CD				Patient ID:			
Tube: Untitled				Panel: Untitled Acquisition Tube List			
Acquisition Date:				Gate: No Gate			
Gated Events: 200000				Total Events: 200000			
X Parameter: FL1-H (Log)				Y Parameter: FL2-H (Log)			
Quad Location: 10, 10							
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	84	0.04	0.04	3.96	3.13	81.82	16.14
UR	40	0.02	0.02	23.23	20.39	34.48	30.17
LL	199864	99.93	99.93	1.56	1.49	2.00	1.82
LR	12	0.01	0.01	21.23	18.56	6.57	6.07

**Abbildung 8:** Exemplarische Quadrantenstatistik des Datensatzes.

Die zur Berechnung der Anzahl von CD34+/CD133+ primitiven Stammzellen dienenden Werte sind beide umrahmt. Gated Events: ausgezählte Ereignisse im Analysefenster = 200.000, UR: detektierte Signale im oberen rechten Quadranten des FL1-FL2-Dotplots = 40.

Anwendung von Formel II (siehe unter 5.8.2):

$$\frac{\text{UR} * \text{LYM}_0 * 10^9/\text{L}}{\text{Gated Events}} = \frac{40 * 2,76 * 10^9/\text{L}}{200.000} = \underline{\underline{552.000}} \quad \text{primitive CD34+/CD133+ Stammzellen je Liter Blut}$$

Das Ergebnis gibt die Anzahl der primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen wieder, nämlich 552.000, die in einem Liter Blut innerhalb der Lymphozytenpopulation zirkulieren.



## 5. Methoden

### **5.8.4 Anzahl der zirkulierenden CD34+, CD34+/CD133–, CD133+ und CD133+/CD34– Zellen**

Die Berechnungen der Anzahl von CD34+, CD34+/CD133–, CD133+ und CD133+/CD34– Zellen je Liter Blut erfolgten ebenfalls mit Formel II (siehe unter 5.8.2), jedoch unter Austausch des Wertes aus dem Quadranten UR im Zähler entsprechend der Antikörpermarkierung mit den folgenden Werten aus den zugehörigen Quadrantenstatistiken:

1. Anzahl der CD34+ Zellen: Summe aus den Werten von UR und LR,
2. Anzahl der CD34+/CD133– Zellen: Wert von LR,
3. Anzahl der CD133+ Zellen: Summe aus den Werten von UR und UL,
4. Anzahl der CD133+/CD34– Zellen: Wert von UL.

### **5.8.5 Berechnung der Anzahl der CD34+, CD34+/CD133–, CD133+ und CD133+/CD34– Zellen an einem Beispiel**

Aus der unter 5.8.3 abgebildeten Quadrantenstatistik (siehe Abbildung 8 auf Seite 38) kann man neben UR auch die Werte für LR = 12 und UL = 84 ablesen. Je nach dem zu berechnenden Zelltyp werden diese Werte, wie unter 5.8.4 beschrieben, in Formel II eingesetzt und so die Anzahl der unter den Lymphozyten zirkulierenden Zellen berechnet. Bei der im Beispiel bereits berechneten durchschnittlichen Lymphozytenzahl von  $2,76 \cdot 10^9/\text{L}$  (siehe unter 5.8.3) ergibt sich für

1. die CD34+ Zellen eine Anzahl von: 717.600 Zellen je Liter Blut,
2. die CD34+/CD133– Zellen eine Anzahl von: 165.600 Zellen je Liter Blut,
3. die CD133+ Zellen eine Anzahl von: 1.711.200 Zellen je Liter Blut,
4. die CD133+/CD34– Zellen eine Anzahl von: 1.159.200 Zellen je Liter Blut.

### 5.9 Bestimmung der BNP-Konzentration

Bei 112 Patienten des Kollektivs wurde die BNP-Konzentration im venösen Blut bestimmt. Dazu wurde der vollautomatische Chemilumineszenz-Immunoassay ADVIA<sup>®</sup> Centaur<sup>®</sup> von Bayer verwendet. Für die Untersuchungen wurde aus 100 µl EDTA-Vollblut das Plasma, welches das BNP enthält, durch Zentrifugieren von den festen Bestandteilen getrennt. Anschließend wurden definierte Mengen von zwei monoklonalen Antikörpern murinen Ursprungs zur Probe gegeben. Beide Antikörper binden an verschiedene Strukturen des BNP. Zuerst wurde der Acridiniumester-markierte Antikörper 5 min. bei 37 °C mit dem EDTA-Plasma inkubiert. Dieser bindet an die Ringstruktur des BNP. Anschließend wurde ein Biotin-markierter Antikörper zugegeben, der an das C-terminale Ende des BNP bindet. Die Probe wurde für weitere 2,5 min. bei 37 °C inkubiert. Dabei entstanden Immunkomplexe zwischen dem BNP und den beiden BNP-spezifischen Antikörpern, wobei es zu einer Chemilumineszenzreaktion der an die Antikörper chemisch gebundenen Substanzen kam. Die nicht gebundenen Antikörper wurden nach der Inkubation ausgewaschen. Anschließend wurde die Chemilumineszenzstrahlung des Immunkomplexes der Probe mit einem Lumineszenz-Messgerät des ADVIA<sup>®</sup>-Systems gemessen. Die Stärke der abgestrahlten Chemilumineszenz steht in direktem positivem Zusammenhang mit der BNP-Konzentration der Probe. Sie wurde in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen. Die Messungen der BNP-Konzentrationen im Blut erfolgten durch die Mitarbeiter des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums der FSU Jena. Als Einheiten des BNP werden pg/ml oder pmol/L genutzt (Umrechnungsfaktor: 1 pg/ml = 0,29 pmol/L bzw. 1 pmol/L = 3,46 pg/ml). Die untere Nachweisgrenze des ADVIA<sup>®</sup>-Assays liegt bei 2 pg/ml (0,58 pmol/L), die obere bei 5000 pg/ml (1445 pmol/L). Die Normwerte sind altersabhängig: bis 45 Jahre < 12,51 pmol/L, 46-55 Jahre < 14,07 pmol/L, 56-65 Jahre < 21,96 pmol/L, 66-75 Jahre < 33,24 pmol/L, ab 76 Jahre < 60,40 pmol/L.

### 5.10 Erfassung klinischer Parameter

Als klinische Parameter wurden die Genese, das Vorhandensein von Niereninsuffizienz und Diabetes mellitus sowie die Einnahme von Statinen erfasst. Die Auswertung erfolgte jeweils durch die Berechnung der prozentualen Anteile dieser Parameter an allen erhobenen Werten.

### 5.11 Statistische Methoden

#### 5.11.1 Analyse des Verteilungstyps

Der Verteilungstyp der Stichprobe wurde bei einer Anzahl von  $n < 30$  je Gruppe nach dem Shapiro-Wilk-Test beurteilt, bei einer Anzahl von  $n \geq 30$  ist der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet worden. Die Nullhypothese ( $H_0$ ) beider Tests besagt, dass die Stichproben innerhalb einer Gruppe normal verteilt sind. Das Signifikanzniveau war mit  $\alpha = 0,1$  festgelegt. War  $p \geq \alpha$ , so galt  $H_0$  als bestätigt und die Annahme einer Normalverteilung als statistisch gesichert ( $\rightarrow$ Signifikanzprüfung mit dem verteilungsabhängigen T-Test). War  $p < \alpha$ , so wurde  $H_0$  abgelehnt, womit das Vorliegen von Normalverteilung statistisch nicht gesichert werden konnte ( $\rightarrow$ Signifikanzprüfung mit verteilungsunabhängigen Tests: Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-Test).

#### 5.11.2 Verteilungsunabhängige Tests

##### 5.11.2.1 Kruskal-Wallis-Test

Der Kruskal-Wallis-Test diente zum globalen Vergleich der Größenordnungen mehrerer, voneinander unabhängiger Gruppen. Seine Nullhypothese ( $H_0$ ) besagt, dass statistisch kein Unterschied zwischen mindestens zwei der untersuchten Gruppen besteht. Das Signifikanzniveau war mit  $\alpha = 0,05$  festgelegt. War  $p \geq \alpha$ , so wurde  $H_0$  bestätigt, war  $p < \alpha$ , wurde  $H_0$  abgelehnt, womit statistisch ein signifikanter Unterschied zwischen mindestens zwei der Gruppen gesichert werden konnte.

##### 5.11.2.2 Mann-Whitney-Test und $\alpha$ -Adjustierung

Mit dem Mann-Whitney-Test wurde das Vorliegen eines signifikanten Unterschiedes der Größenordnungen zwischen je zwei verschiedenen und voneinander unabhängigen Gruppen geprüft. Die Nullhypothese ( $H_0$ ) besagt, dass sich die Größenordnungen der verglichenen Gruppen nicht voneinander unterscheiden. Das Signifikanzniveau war mit  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Beim paarweisen Vergleich der vier NYHA-Gruppen wurden insgesamt 6 Mann-Whitney-Tests durchgeführt. Die Signifikanzen wurden exakt berechnet. Anschließend wurden die

## 5. Methoden

ermittelten p-Werte einer  $\alpha$ -Adjustierung unterzogen. Dazu wurden sie der Größe nach geordnet und nach den in Tabelle 4 dargestellten Signifikanzschranken des nach Shaffer modifizierten Holm-Verfahrens (Horn und Vollandt 1995) bewertet. Mit dem kleinsten p-Wert beginnend wurden sie nacheinander mit den rangzugehörigen Signifikanzschranken verglichen. War der p-Wert kleiner als seine Schranke, wurde  $H_0$  abgelehnt und die Unterschiede der Größenordnungen der verglichenen Gruppen als signifikant betrachtet. Das Testverfahren wurde abgebrochen, sobald ein untersuchter p-Wert größer als seine Signifikanzschranke war. Dieser sowie alle restlichen, ranghöhere p-Werte wurden nicht weiter untersucht und ihre Größenordnungen als gleich ( $H_0$  bestätigt) betrachtet.

**Tabelle 4:** Signifikanzschranken nach dem von Shaffer modifizierten Holm-Verfahren für den Vergleich von 4 unabhängigen Gruppen. (Horn 1995)

Anzahl der Gruppen: 4	durchgeführte Mann-Whitney-Tests: 6					
Rangfolge der p-Werte aus den Mann-Whitney-Tests beginnend mit dem kleinsten	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Signifikanzschranken	$\alpha/6$ (= 0,008)	$\alpha/3$ (= 0,016)	$\alpha/3$ (= 0,016)	$\alpha/3$ (= 0,016)	$\alpha/2$ (= 0,025)	$\alpha$ (= 0,05)

### 5.11.3 Verteilungsabhängiger T-Test

Konnte statistisch eine Normalverteilung der beobachteten Werte in den NYHA-Gruppen nachgewiesen werden, so wurde im Folgenden der T-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Seine Nullhypothese ( $H_0$ ) besagt, dass sich die untersuchten Gruppen im Mittel nicht voneinander unterscheiden. Das Signifikanzniveau war mit  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

### 5.11.4 Analyse der prozentualen Anteile von Stammzellen

Die Ermittlung der prozentualen Anteile der gemessenen primitiven Stammzellen erfolgte an den durchschnittlichen Leukozyten- und Lymphozytenzahlen sowie an der Anzahl der im

## 5. Methoden

peripheren Blut zirkulierenden CD34+ Stammzellen. Zur Berechnung wurde der Dreisatz verwendet. Die Gesamtzahl der Leukozyten, der Lymphozyten sowie der CD34+ Stammzellen entsprach jeweils gleich 100 %. Der prozentuale Anteil (x) der Stammzellen an jeder dieser drei Zellpopulationen wurde wie folgt ermittelt:

$$\text{Zellpopulation} / 100 = \text{Stammzellen} / x.$$

### 5.11.5 Analyse der Korrelationen (statistische Zusammenhänge)

Es war zu klären, ob Korrelationen zwischen den untersuchten Stammzellpopulationen bestehen. Außerdem wurden die statistischen Zusammenhänge der Stammzellpopulationen mit dem BNP und den NYHA-Gruppen geprüft sowie zwischen dem BNP und den NYHA-Gruppen untersucht. Alle genannten Variablen waren voneinander unabhängig. Zur Analyse der statistischen Zusammenhänge wurde zuerst mit SPSS die Kurvenanpassung beider zu untersuchenden Variablen geprüft. Anschließend wurde ein Streu-/Punktediagramm (Scatterplot) beider Variablen erstellt und die Anpassungslinie entsprechend dem Ergebnis aus der Kurvenanpassungsanalyse eingezeichnet. Außerdem wurde eine bivariate Korrelationsanalyse durchgeführt. War die Kurvenanpassung linear (Häufung der Stichprobenwerte um eine Gerade), so wurde der Zusammenhang mit dem Korrelationskoeffizienten (r) nach Pearson bewertet. Bei monotonem Zusammenhang (Häufung der Punkte um eine Kurve) wurde r nach Spearman verwendet. Die Nullhypothese ( $H_0$ ) der bivariaten Korrelationsanalyse geht davon aus, dass es statistisch keinen Zusammenhang zwischen den untersuchten Merkmalen gibt. Das Signifikanzniveau war mit  $\alpha = 0,05$  festgelegt. War  $p \geq \alpha$ , so wurde  $H_0$  bestätigt, war  $p < \alpha$ , galt das Vorliegen einer Korrelation statistisch als gesichert. Der zugehörige Korrelationskoeffizient (r) gibt die Stärke und die Richtung des statistischen Zusammenhangs an. Er kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Im Falle von  $r = 0$  liegt statistisch kein Zusammenhang vor. Folgende Grenzen sind für die Bewertung des Korrelationskoeffizienten verwendet worden: Zwischen  $-0,3 < r < +0,3$  wurde ein schwacher, zwischen  $+/- 0,3 < r < +/- 0,7$  ein mittlerer und zwischen  $+/- 0,7 < r < +/- 1$  ein starker statistischer Zusammenhang angenommen. Das Vorzeichen legt fest, ob diese Korrelation positiv (+) oder negativ (-) ist und sich die Werte im Scatterplot einer steigende oder fallenden Gerade (linear) bzw. Kurve (monoton) annähern. Auf Grund von Korrelationen können jedoch keine Aussagen über kausale Zusammenhänge gemacht werden.

## 6. Ergebnisse

### 6.1 Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Die Messungen der Stammzellzahlen erfolgten bei 178 ausschließlich männlichen Patienten. Davon waren  $n_1 = 44$  Patienten im Stadium NYHA I,  $n_2 = 47$  in NYHA II,  $n_3 = 53$  in NYHA III und  $n_4 = 34$  in NYHA IV. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Die Genese der Herzschwäche war im untersuchten Kollektiv überwiegend ischämisch (43,2 %), am zweithäufigsten war die Herzinsuffizienz dilatativ bedingt (29,7 %). Mit dem NYHA-Stadium nahm der prozentuale Anteil der ischämischen Genese von allen am meisten zu. Er stieg von 23,9 % in NYHA I auf 75,0 % in NYHA IV.

Das Alter war in NYHA III ( $64 \pm 11$  J.) und IV ( $67 \pm 12$  J.) signifikant höher als in NYHA I ( $53 \pm 13$  J.) und II ( $59 \pm 13$  J.) ( $p < 0,001$ ). In den Gruppen NYHA I und II sowie in NYHA III und IV war das Alter statistisch betrachtet gleich ( $p = 0,073$ ,  $p = 0,300$ ).

Das Vorhandensein von Begleiterkrankungen wie Niereninsuffizienz und Diabetes mellitus stieg prozentual mit dem NYHA-Stadium an. Der Anteil der Niereninsuffizienz nahm dabei von 9,1 % in NYHA I auf 58,3 % in NYHA IV zu, der von Diabetes mellitus erhöhte sich von 24,4 % in NYHA I auf 44,0 % in NYHA IV.

Die Statintherapie war in den hohen NYHA-Stadien häufiger vertreten als in den niedrigen. Die Einnahme der HMG-CoA-Reduktasemmer stieg prozentual von 36,4 % in NYHA I auf 79,2 % in NYHA IV an.

Die BNP-Konzentration des peripheren Blutes war durchschnittlich in NYHA I am niedrigsten ( $85,11 \pm 91,98$  pg/ml) und in NYHA IV am höchsten ( $2400,64 \pm 1570,88$  pg/ml). Der Anstieg zwischen den NYHA-Gruppen war stets signifikant ( $p \leq 0,01$ ). Ihre Auswertung erfolgt separat unter dem Gliederungspunkt 6.11 dieser Arbeit.

Die Ergebnisse der Leukozyten- und Lymphozytenzahlen des untersuchten Kollektivs sind in Tabelle 5 ebenfalls mit aufgeführt. Durchschnittlich hatten die Herzinsuffizienten  $8,46 \pm 2,82 \cdot 10^9/L$  Leukozyten und  $1,58 \pm 0,71 \cdot 10^9/L$  Lymphozyten im Blut. Ihre ausführliche Auswertung erfolgt separat unter dem Gliederungspunkt 6.10.

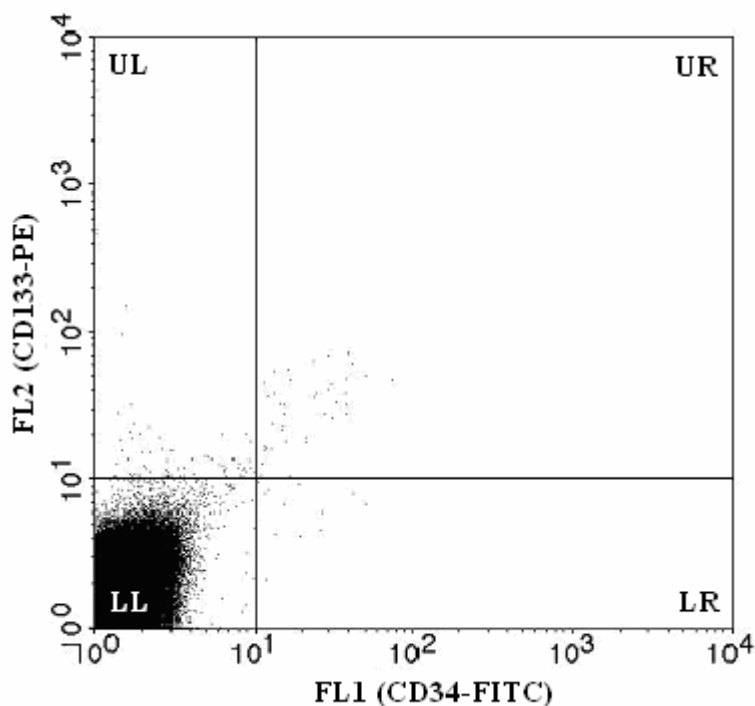
## 6. Ergebnisse

**Tabelle 5: Überblick über die Charakteristika des Patientenkollektivs.**

		<b>gesamt</b>	<b>NYHA I</b>	<b>NYHA II</b>	<b>NYHA III</b>	<b>NYHA IV</b>
<b>Genese</b>	ischämisch	43,2 %	23,9 %	32,6 %	55,8 %	75,0 %
	dilatativ	29,7 %	34,8 %	39,1 %	18,6 %	10,7 %
	hypertensiv	16,8 %	26,1 %	17,4 %	20,9 %	0,0 %
	entzündlich	5,4 %	13,0 %	6,5 %	0,0 %	3,6 %
	valvulär	4,9 %	2,2 %	4,4 %	4,7 %	10,7 %
<b>Alter</b> (in Jahren)		61 +/- 13	53 +/- 13	59 +/- 13	64 +/- 11	67 +/- 12
<b>Leukozyten</b> (10 <sup>9</sup> je Liter)		8,46 +/- 2,82	7,23 +/- 1,86	8,57 +/- 2,03	8,13 +/- 2,40	10,41 +/- 4,17
<b>Lymphozyten</b> (10 <sup>9</sup> je Liter)		1,58 +/- 0,71	1,79 +/- 0,52	1,90 +/- 0,68	1,50 +/- 0,69	0,99 +/- 0,65
<b>Diabetes mellitus</b>	ja	33,8 %	24,4 %	35,6 %	35,7 %	44,0 %
	nein	66,2 %	75,6 %	64,4 %	64,3 %	56,0 %
<b>Niereninsuffizienz</b>	ja	33,1 %	9,1 %	31,1 %	47,4 %	58,3 %
	nein	66,9 %	90,9 %	68,9 %	52,6 %	41,7 %
<b>Statintherapie</b>	ja	50,3 %	36,4 %	43,5 %	55,8 %	79,2 %
	nein	49,7 %	63,6 %	56,5 %	44,2 %	20,8 %
<b>BNP (pg/ml)</b>		992,64 +/- 696,68	85,11 +/- 91,98	339,45 +/- 286,38	1145,37 +/- 837,47	2400,64 +/- 1570,88

## 6.2 Auswertung der durchflusszytometrischen Probenanalyse

Bei den durchflusszytometrischen Messungen wurden, wie im Material- und Methodenteil der vorliegenden Arbeit beschrieben, mittels Zwei-Farben-Fluoreszenz die Anzahl der im Blut zirkulierenden primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen aus 200.000 Ereignissen gemessen und anschließend ihre Anzahl in einem Liter Blut berechnet. Die Abbildung 9 ist beispielhaft für einen mit Cell-Quest Pro<sup>TM</sup> erstellten FL1-FL2-Dotplot der durchgeführten Untersuchungen aus einem Probenansatz mit Anti-CD34 (FL1) und Anti-CD133 (FL2). Es wurden insgesamt 200.000 Zellen aus der Lymphozytenpopulation ausgewertet. Die doppelt positiven Zellen befinden sich im Feld Upper Right (UR). Im hier dargestellten Beispiel (siehe unter 5.8.3 und 5.8.5) wurden in UR = 40 Ereignisse von 200.000 ausgezählten Zellen (Gated Events) gemessen, welche Signale von beiden gemessenen Fluoreszenzen (FL) emittierten. Bei einer durchschnittlichen Lymphozytenzahl ( $LYM_0$ ) von  $2,76 \cdot 10^9$  je Liter Blut ergibt sich daraus eine Anzahl von 522.000 CD34+/CD133+ Zellen, die in einem Liter Blut zirkulieren.



**Abbildung 9:** Exemplarischer FL1-FL2-Dotplot der Probenanalyse nach Anfärbung der Zellen mit Anti-CD34-FITC (FL1) und Anti-CD133-PE (FL2).

UL, UR, LL und LR bezeichnen die Quadranten, UL: CD133+/CD34– Zellen, UR: CD34+/CD133+ Zellen, LR: CD34+/CD133– Zellen, LL: CD34–/CD133– Zellen, Skalierung logarithmisch.



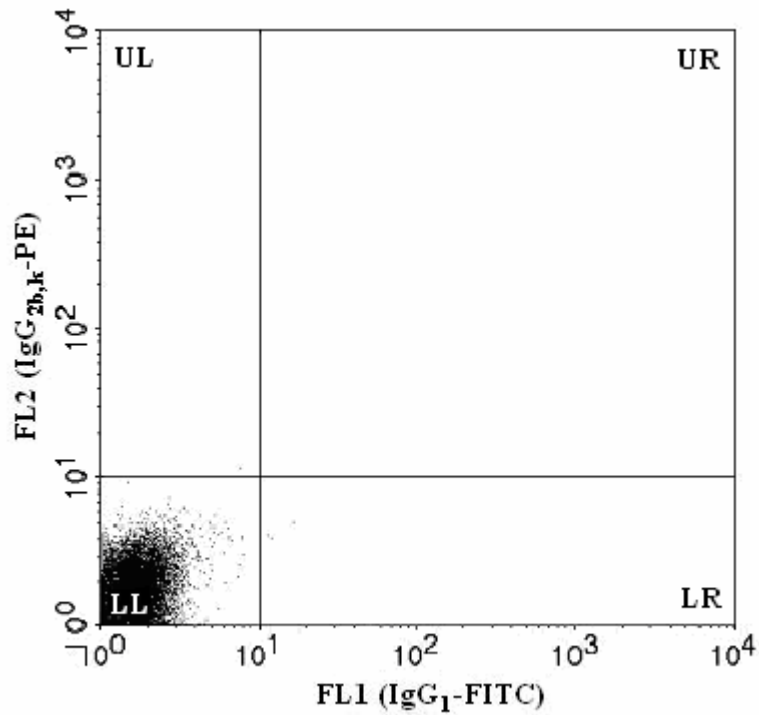
## 6. Ergebnisse

Die Quadranten UR und Lower Right (LR) gemeinsam stellen die gesamten CD34+ Zellen dar, die gemessen wurden. In beiden Quadranten sind insgesamt UR (40) + LR (12) = 52 Ereignisse abgebildet. Das ergibt eine Anzahl von 717.600 CD34+ Zellen je Liter Blut. In LR befinden sich all diejenigen CD34+ Zellen, die kein CD133 exprimieren. Davon wurden LR = 12 Signale gemessen. Die Anzahl der CD34+/CD133– Zellen beträgt hier somit 165.600 je Liter Blut. Die Summe aus den Ereignissen von UR und Upper Left (UL) ergibt die Anzahl aller CD133+ Zellen. In diesen beiden Quadranten sind insgesamt UR (40) + UL (84) = 124 Ereignisse dargestellt, was einer Anzahl von 1.711.200 CD133+ Zellen je Liter Blut entspricht. In UL befinden sich alle Zellen, die nur positiv für CD133 sind, denen CD34 aber fehlt. Im vorliegenden Beispiel wurden UL = 84 Fluoreszenzen detektiert, was eine Anzahl von 1.159.200 CD133+/CD34– Zellen je Liter Blut ausmacht. In Lower Left (LL) befinden sich all diejenigen Zellen, die sowohl negativ für CD34 als auch für CD133 waren und somit keine der beiden Fluoreszenzen FITC oder PE emittiert haben. In diesem Quadranten befinden sich LL = 199864 eingezeichnete Signalpunkte. Ihre Anzahl wurde in der Arbeit nicht berechnet. Die Abbildung 9 ist vergleichbar mit allen anderen durchgeführten Messungen des Datensatzes, die in die Auswertungen der vorliegenden Arbeit einbezogen wurden. Sie steht stellvertretend für diese.

Abbildung 10 zeigt eine Isotypkontrolle dieser Arbeit im FL1-FL2-Dotplot. FL1 entspricht den Fluoreszenzen des Isotypkontrolle-Antikörpers IgG<sub>1</sub>-FITC, FL2 denen von Anti-IgG<sub>2b,κ</sub>-PE. In UR wurden keine Ereignisse detektiert, in LR waren es 3 Ereignisse und in UL gleich 1 Ereignis. Als Ausschlusskriterium für die Verwendung der Probe war festgelegt, dass mindestens 95 % der Signale der Isotypkontrolle im Quadranten LL liegen mussten. Von 20.000 gezählten Ereignissen entsprechen im gezeigten Beispiel die Ereignisse aus UR (0) + UL (1) + LR (3) gleich 99,8 %. Diese Abbildung ist exemplarisch für alle Isotypkontrollen des Datensatzes dieser Arbeit, die in die Auswertung einbezogen wurden.

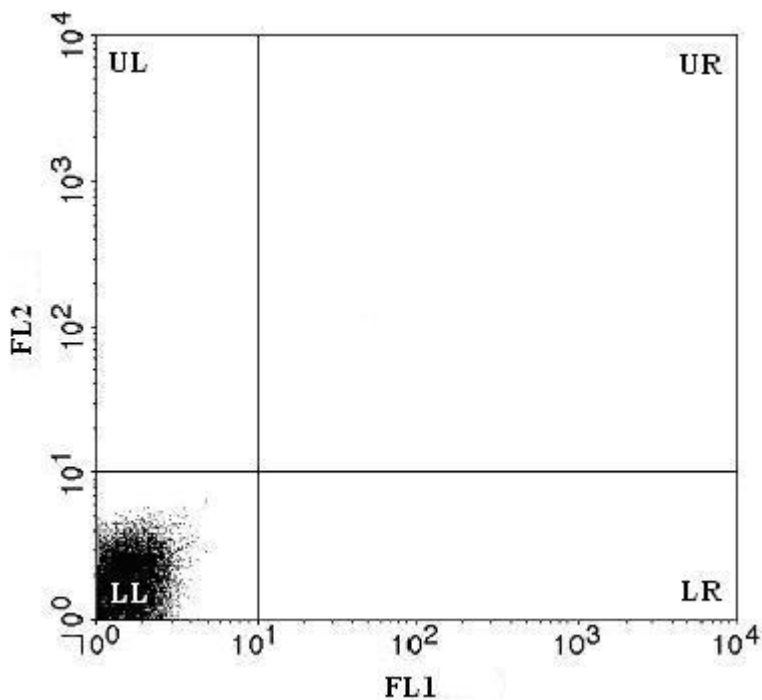
In Abbildung 11 ist eine Negativkontrolle, in der die Zellen nicht mit Antikörpern angefärbt wurden, ebenfalls im FL1-FL2-Dotplot graphisch dargestellt. In den Feldern UR, UL sowie LR waren keine Ereignisse nachzuweisen, womit 100 % der Ereignisse im Quadranten LL lagen. Als Ausschlusskriterium der Negativkontrolle war festgelegt, dass nahezu 100 % der Ereignisse im Quadranten LL liegen, um die zugehörige Probe in die Auswertung einzubeziehen. Die Abbildung ist ebenfalls exemplarisch für die Negativkontrollen der Messungen, welche in die Auswertung dieser Arbeit eingeschlossen wurden.

## 6. Ergebnisse



**Abbildung 10:** Exemplarischer FL1-FL2-Dotplot einer Isotypkontrolle des Datensatzes nach Anfärbung der Zellen mit den Isotypkontrolle-Antikörpern Maus-IgG<sub>1</sub>-FITC und Maus-IgG<sub>2b,k</sub>-PE.

UL, UR, LL und LR bezeichnen die Quadranten, FL1: Fluoreszenz 1 = FITC; FL2: Fluoreszenz 2 = PE.



**Abbildung 11:** Exemplarischer FL1-FL2-Dotplot einer Negativkontrolle des Datensatzes, keine Anfärbung der Zellen. UL, UR, LL und LR bezeichnen die Quadranten, FL1: Fluoreszenz 1, FL2: Fluoreszenz 2.

### 6.3 Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen

#### 6.3.1 Primitive CD34+/CD133+ Stammzellen: NYHA-Gruppen und insgesamt

Die Anzahl der CD34+/CD133+ primitiven Stammzellen jeder Patientenblutprobe wurde einzeln, wie im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben, durchflusszytometrisch ermittelt und berechnet und anschließend mit SPSS 14.0 für jede NYHA-Gruppe sowie für alle Gruppen insgesamt der Mittelwert, der Median und die Standardabweichung pro Liter Blut bestimmt. In Tabelle 6 sind diese Werte zusammengefasst und in Abbildung 12 graphisch in Boxplots dargestellt.

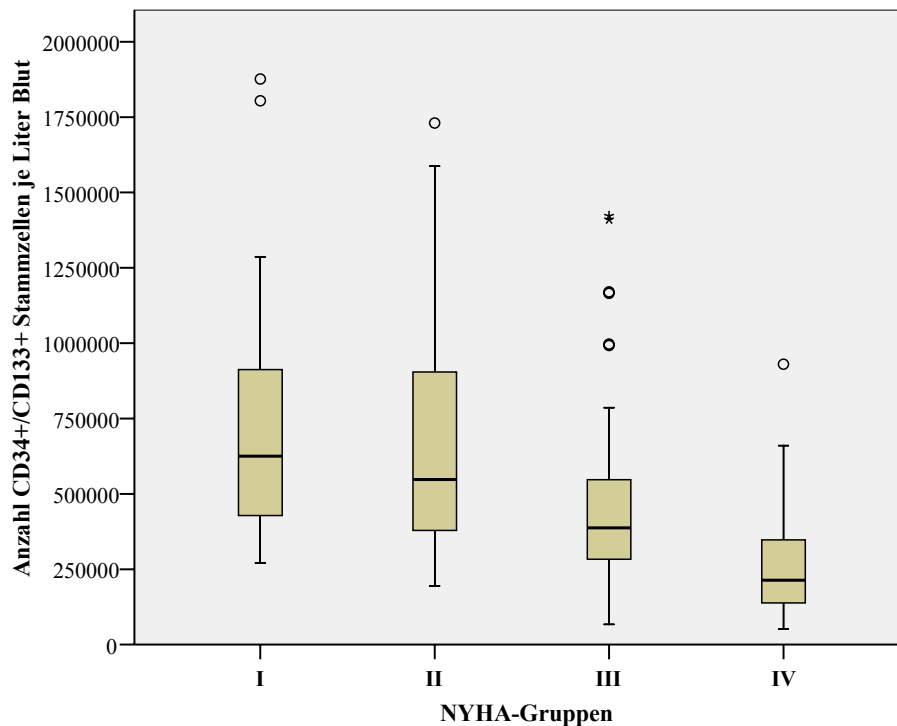
**Tabelle 6:** Überblick über Mittelwert, Median und Standardabweichung der Anzahl von CD34+/CD133+ Stammzellen je Liter Blut in den NYHA-Gruppen I bis IV sowie insgesamt.

CD34+/CD133+ Zellen	NYHA I	NYHA II	NYHA III	NYHA IV	gesamt
Mittelwert	708.263	695.668	480.821	279.305	541.014
Median	625.050	547.600	387.600	213.420	443.418
Standardabweichung	387.254	415.400	312.402	199.608	328.666

Die Ergebnisse aus Tabelle 6 und Abbildung 12 zeigen deutlich, dass die mittlere Anzahl der CD34+/CD133+ Stammzellen je Liter peripheren Blutes kontinuierlich mit ansteigendem Schweregrad der Herzschwäche von NYHA I ( $0,71 \pm 0,39$  Zellen/ $\mu$ l Blut) über NYHA II ( $0,70 \pm 0,42$  Zellen/ $\mu$ l Blut) und NYHA III ( $0,48 \pm 0,31$  Zellen/ $\mu$ l Blut) bis NYHA IV ( $0,28 \pm 0,20$  Zellen/ $\mu$ l Blut) abnahm. Insgesamt betrug die Anzahl der CD34+/CD133+ Stammzellen durchschnittlich  $0,54 \pm 0,33$  Zellen/ $\mu$ l Blut.

Bei der statistischen Auswertung zeigte sich, dass keine Normalverteilung der Messwerte in den vier NYHA-Gruppen vorlag. Es konnte ein signifikanter Unterschied der Größenordnungen der primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen zwischen den vier NYHA-Gruppen gesichert werden ( $p < 0,001$ ). Tabelle 7 zeigt die beim Vergleich der vier NYHA-Gruppen ermittelten p-Werte im Überblick.

## 6. Ergebnisse



**Abbildung 12:** Graphische Darstellung (Boxplots) der Anzahl von CD34+/CD133+ Stammzellen je Liter Blut bei herzinsuffizienten Patienten mit den Schweregraden NYHA I bis IV.

[° - Beobachtungswerte, deren Abstände von der Box mehr als das 1,5-Fache der Boxhöhe betragen. \* : Extremer Wert, der von der Box mehr als das 3-Fache der Boxhöhe entfernt ist. Dies gilt für alle weiteren Boxplots dieser Arbeit.]

**Tabelle 7:** Überblick über die mit SPSS 14.0 ermittelten p-Werte aus dem Mann-Whitney-Test. Paarweiser Vergleich von jeweils zwei der vier NYHA-Gruppen zum statistischen Nachweis eines signifikanten Unterschiedes der Größenordnungen von primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen zwischen den Gruppen.

vergichene NYHA-Gruppen	p-Werte (exakte Berechnung)
I und II	$p_{1,2} = 0,739$
I und III	$p_{1,3} = 0,001$
I und IV	$p_{1,4} < 0,001$
II und III	$p_{2,3} = 0,004$
II und IV	$p_{2,4} < 0,001$
III und IV	$p_{3,4} < 0,001$

## 6. Ergebnisse

Bei der anschließenden  $\alpha$ -Adjustierung wurden die sechs ermittelten p-Werte, mit dem kleinsten beginnend, der Größe nach sortiert und mit den Signifikanzschranken des nach Shaffer modifizierten Holm-Verfahrens geprüft. Bei den Gruppenpaaren NYHA I und III ( $p_{1,3} = 0,001$ ), NYHA I und IV ( $p_{1,4} < 0,001$ ), NYHA II und III ( $p_{2,3} = 0,004$ ), NYHA II und IV ( $p_{2,4} < 0,001$ ) sowie NYHA III und IV ( $p_{3,4} < 0,001$ ) war statistisch ein signifikanter Unterschied in der Anzahl von CD34+/CD133+ Stammzellen nachweisbar. Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen den Gruppen NYHA I und II ( $p_{1,2} = 0,743$ ) gesichert werden.

### 6.3.2 Primitive CD34+/CD133+ Stammzellen: leichte und schwere Herzschwäche

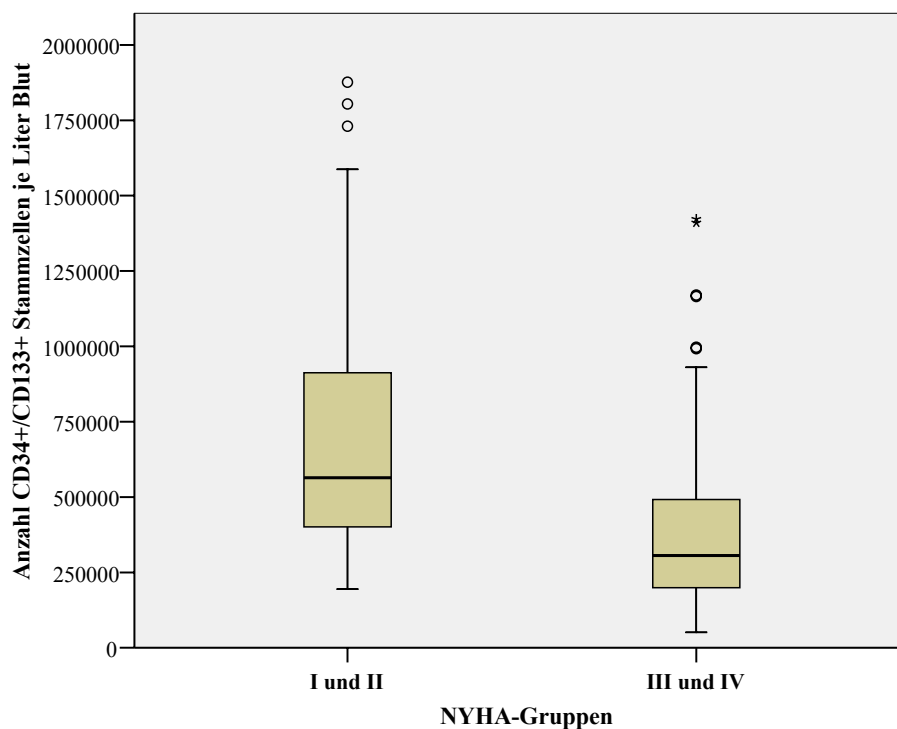
Zum Vergleich der Größenordnungen von CD34+/CD133+ Stammzellen zwischen der leichten und schweren Form der Herzinsuffizienz sind die Stichprobenwerte der NYHA-Gruppen I und II zur Gruppe „leichte Herzschwäche“ und der NYHA-Gruppen III und IV zur Gruppe „schwere Herzinsuffizienz“ zusammengefasst worden. Tabelle 8 zeigt die Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen dieser beiden Formen. In Abbildung 13 sind die ermittelten Werte graphisch als Boxplots dargestellt.

Die Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen von Patienten mit leichter Herzschwäche der Stadien NYHA I und NYHA II ( $0,70 \pm 0,40$  Zellen/ $\mu$ l Blut) waren im Mittel deutlich höher als bei den Patienten mit den schweren Formen NYHA III und NYHA IV ( $0,40 \pm 0,29$  Zellen/ $\mu$ l Blut). Statistisch war dieser Unterschied als signifikant zu betrachten ( $p < 0,001$ ).

## 6. Ergebnisse

**Tabelle 8:** Überblick über Mittelwert, Median und Standardabweichung der Anzahl von CD34+/CD133+ primitiven Stammzellen je Liter Blut bei den jeweils zu Paaren zusammengefassten Gruppen NYHA I und II („leichte Herzschwäche“) sowie NYHA III und IV („schwere Herzinsuffizienz“).

CD34+/CD133+ Zellen	NYHA I und II „leichte Herzschwäche“	NYHA III und IV „schwere Herzinsuffizienz“
Mittelwert	701.758	402.068
Median	564.000	306.150
Standardabweichung	399.858	289.966



**Abbildung 13:** Graphische Darstellung (Boxplots) der Anzahl von CD34+/CD133+ Stammzellen bei der Gegenüberstellung der „leichten Herzschwäche“ (NYHA I und II) und der „schweren Herzinsuffizienz“ (NYHA III und IV).

## 6.4 Anzahl der zirkulierenden CD34+ Stammzellen

### 6.4.1 Zirkulierende CD34+ Zellen: NYHA-Gruppen und insgesamt

Die Gesamtzahl aller CD34-positiven Stammzellen umfasste neben der Anzahl der CD34+/CD133+ Stammzellen alle Zellpopulationen, die positiv für CD34 und negativ für CD133 waren. Tabelle 9 zeigt die Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der CD34+ Stammzellen in den NYHA-Gruppen I bis IV sowie bei den Stichproben insgesamt. In Abbildung 14 sind die Ergebnisse graphisch als Boxplots dargestellt.

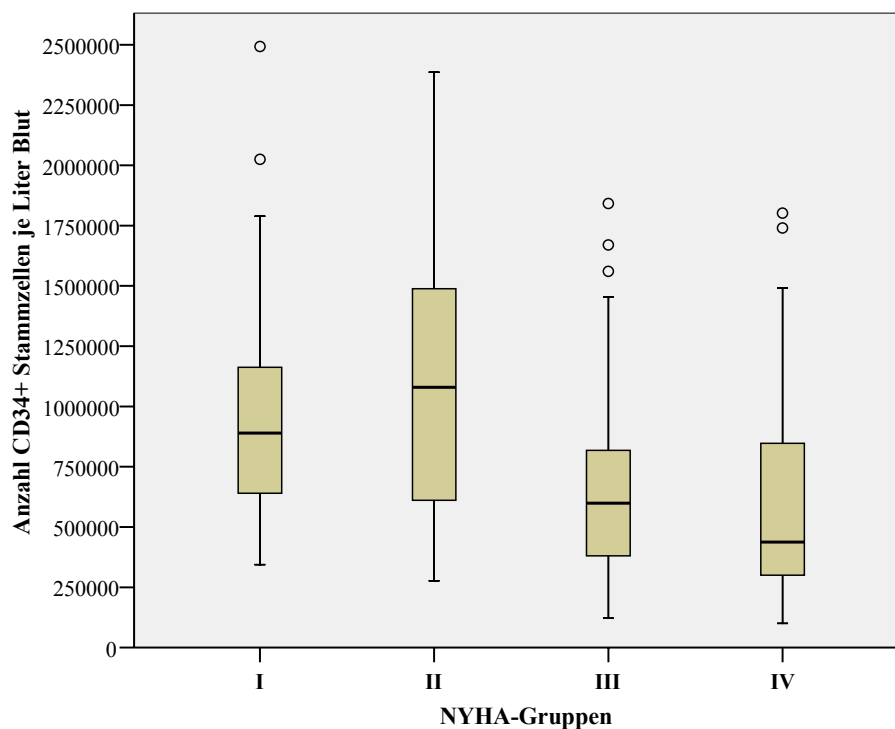
**Tabelle 9:** Überblick über Mittelwert, Median und Standardabweichung der Anzahl von CD34+ Stammzellen je Liter Blut in den NYHA-Gruppen I bis IV sowie insgesamt.

CD34+ Zellen	NYHA I	NYHA II	NYHA III	NYHA IV	gesamt
Mittelwert	1.119.489	1.133.721	675.102	579.375	876.922
Median	889.450	1.079.400	598.975	437.923	751.437
Standardabweichung	982.871	645.270	395.630	429.630	613.350

Die statistische Auswertung der Gesamtzahl der CD34+ Stammzellen zeigte kein Vorliegen von Normalverteilung in den vier NYHA-Gruppen. Die Werte der CD34+ Zellen waren in NYHA I ( $1,12 \pm 0,98$  Zellen/ $\mu$ l Blut) und NYHA II ( $1,13 \pm 0,65$  Zellen/ $\mu$ l Blut) wesentlich höher als in NYHA III ( $0,68 \pm 0,40$  Zellen/ $\mu$ l Blut) und NYHA IV ( $0,58 \pm 0,43$  Zellen/ $\mu$ l Blut). Im gesamten Kollektiv betrug die Anzahl der CD34+ Stammzellen durchschnittlich  $0,88 \pm 0,61$  Zellen/ $\mu$ l Blut.

Statistisch bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Größenordnungen der Gruppenpaare NYHA I und NYHA III ( $p_{1,3} < 0,001$ ), NYHA I und NYHA IV ( $p_{1,4} < 0,001$ ), NYHA II und NYHA III ( $p_{2,3} < 0,001$ ) sowie NYHA II und NYHA IV ( $p_{2,4} < 0,001$ ). Kein Unterschied der Größenordnungen konnte statistisch zwischen den Gruppen NYHA I und NYHA II ( $p_{1,2} = 0,413$ ) sowie zwischen NYHA III und NYHA IV ( $p_{3,4} = 0,109$ ) gesichert werden.

## 6. Ergebnisse



**Abbildung 14:** Graphische Darstellung (Boxplots) der Anzahl von CD34+ Stammzellen je Liter Blut bei herzinsuffizienten Patienten mit den Schweregraden NYHA I bis IV.

### 6.4.2 Zirkulierende CD34+ Zellen: leichte und schwere Herzschwäche

Der Vergleich der Größenordnungen von CD34+ Zellen zwischen Patienten mit leichter Herzschwäche (NYHA I und II) und den schweren Formen der Herzinsuffizienz (NYHA III und IV) zeigte durchschnittlich wesentlich höhere Werte bei den leichten NYHA-Stadien ( $1,13 \pm 0,82$  Zellen/ $\mu$ l Blut) als bei solchen Patienten mit den hohen Schweregraden ( $0,64 \pm 0,41$  Zellen/ $\mu$ l Blut). In Tabelle 10 sind der Mittelwert, der Median und die Standardabweichung von diesen beiden Gruppen zusammengefasst. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse graphisch als Boxplots.

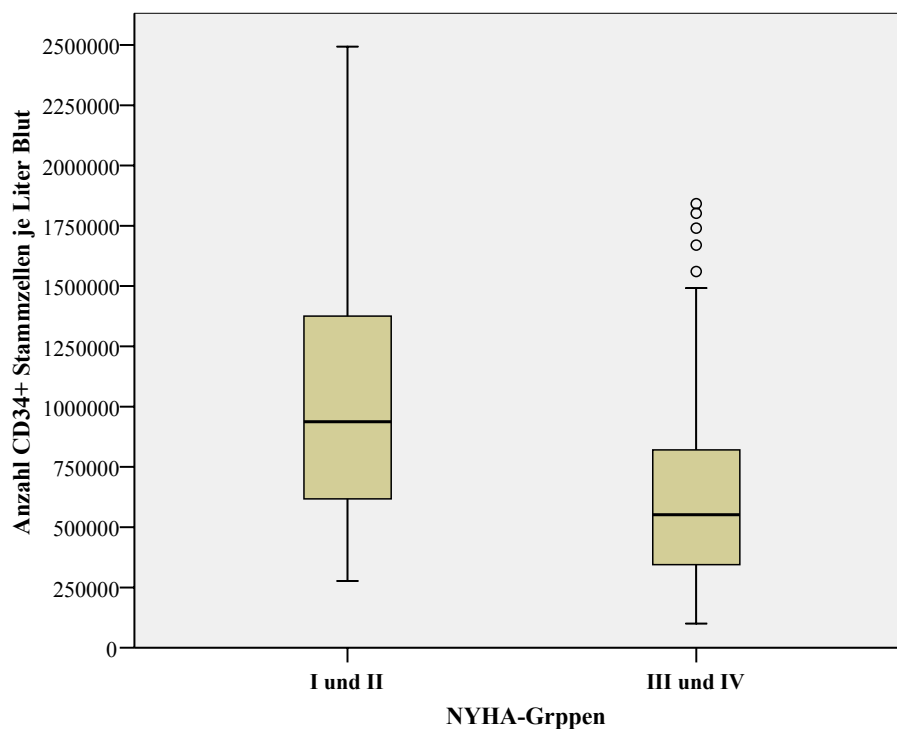
Die Stichprobenwerte der CD34+ Stammzellen beider Gruppen waren nicht normal verteilt. Die Anzahl der CD34+ Stammzellen war bei den schweren Formen der Herzschwäche um fast die Hälfte geringer als bei den leichten. Dieser Unterschied konnte statistisch als hoch signifikant gesichert werden ( $p < 0,001$ ).



## 6. Ergebnisse

**Tabelle 10:** Überblick über Mittelwert, Median und Standardabweichung der Anzahl von CD34+ Stammzellen je Liter Blut bei den jeweils zu Paaren zusammengefassten Gruppen NYHA I und II („leichte Herzschwäche“) sowie NYHA III und IV („schwere Herzinsuffizienz“).

CD34+ Zellen	NYHA I und II „leichte Herzschwäche“	NYHA III und IV „schwere Herzinsuffizienz“
Mittelwert	1.126.839	637.692
Median	937.300	551.760
Standardabweichung	821.228	409.484



**Abbildung 15:** Graphische Darstellung (Boxplots) der Anzahl von CD34+ Stammzellen bei der Gegenüberstellung der „leichten Herzschwäche“ (NYHA I und II) und der „schweren Herzinsuffizienz“ (NYHA III und IV).

## 6.5 Anzahl der zirkulierenden CD34+/CD133– Zellen

### 6.5.1 Zirkulierende CD34+/CD133– Zellen: NYHA-Gruppen und insgesamt

Die Analyse der Anzahl von CD34+/CD133– Stammzellen erfolgte ausschließlich mit Zellen, die den Antikörper CD34-FITC gebunden haben. In Tabelle 11 sind die Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der Anzahl von CD34+/CD133– Stammzellen für alle NYHA-Gruppen sowie der Stichproben insgesamt zusammengefasst. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse graphisch in Form von Boxplots dargestellt.

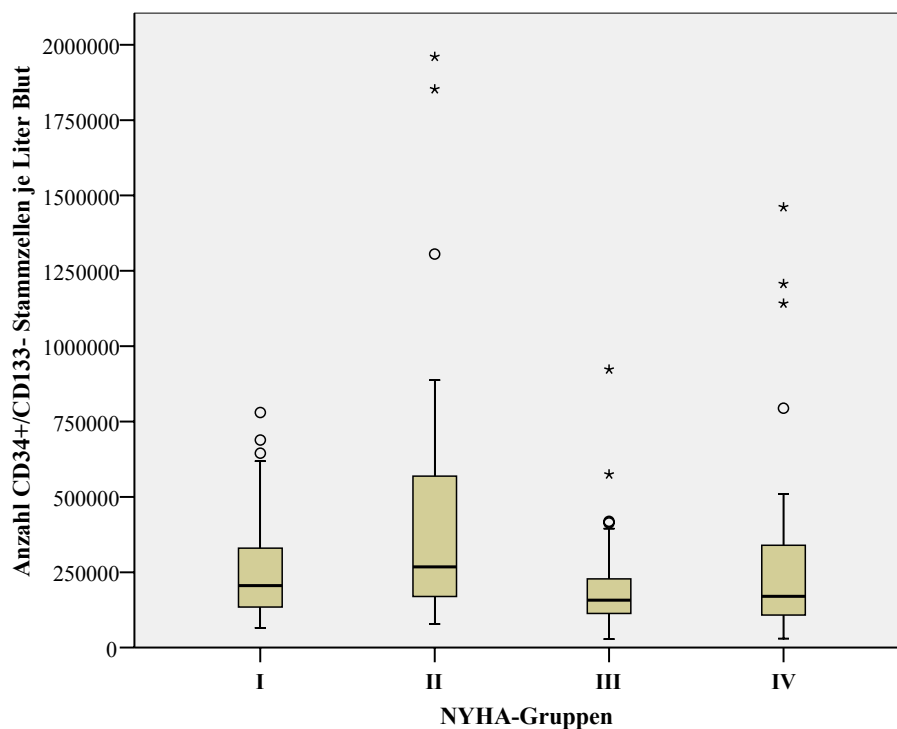
**Tabelle 11:** Überblick über Mittelwert, Median und Standardabweichung der Anzahl von CD34+/CD133– Stammzellen je Liter Blut in den NYHA-Gruppen I bis IV sowie insgesamt.

CD34+/CD133– Zellen	NYHA I	NYHA II	NYHA III	NYHA IV	gesamt
Mittelwert	411.226	438.053	194.281	300.071	335.908
Median	205.650	267.750	157.500	170.083	200.246
Standardabweichung	787.233	414.836	147.700	345.871	423.910

Die Stichprobenwerte in den vier NYHA-Gruppen waren nicht normal verteilt. Die Anzahl der CD34+/CD133– Stammzellen war in NYHA I ( $0,41 \pm 0,79$  Zellen/ $\mu$ l Blut) und NYHA II ( $0,44 \pm 0,41$  Zellen/ $\mu$ l Blut) durchschnittlich wesentlich höher als in NYHA III ( $0,19 \pm 0,15$  Zellen/ $\mu$ l Blut) und NYHA IV ( $0,30 \pm 0,35$  Zellen/ $\mu$ l Blut). Im gesamten untersuchten Kollektiv der Herzinsuffizienten betrug die Anzahl der CD34+/CD133– Stammzellen durchschnittlich  $0,34 \pm 0,42$  Zellen/ $\mu$ l Blut.

Es gab einen Anstieg der Anzahl der CD34+/CD133– Stammzellen von NYHA I zu NYHA II, der statistisch signifikant war ( $p_{1,2} = 0,037$ ). In der NYHA-Gruppe III wurden die niedrigsten Stammzellzahlen gemessen. Statistisch konnten die Unterschiede der Größenordnungen zwischen den Gruppen NYHA I und III ( $p_{1,3} = 0,057$ ), NYHA I und IV ( $p_{1,4} = 0,367$ ) sowie NYHA III und IV ( $p_{3,4} = 0,470$ ) nicht gesichert werden. Zwischen den Gruppen NYHA II und III ( $p_{2,3} < 0,001$ ) und NYHA II und IV ( $p_{2,4} = 0,011$ ) dagegen waren die Unterschiede der Größenordnungen von CD34+/CD133– Stammzellen signifikant.

## 6. Ergebnisse



**Abbildung 16:** Graphische Darstellung (Boxplots) der Anzahl von CD34+/CD133– Stammzellen je Liter Blut bei herzinsuffizienten Patienten mit den Schweregraden NYHA I bis IV.

### 6.5.2 Zirkulierende CD34+/CD133– Zellen: leichte und schwere Herzschwäche

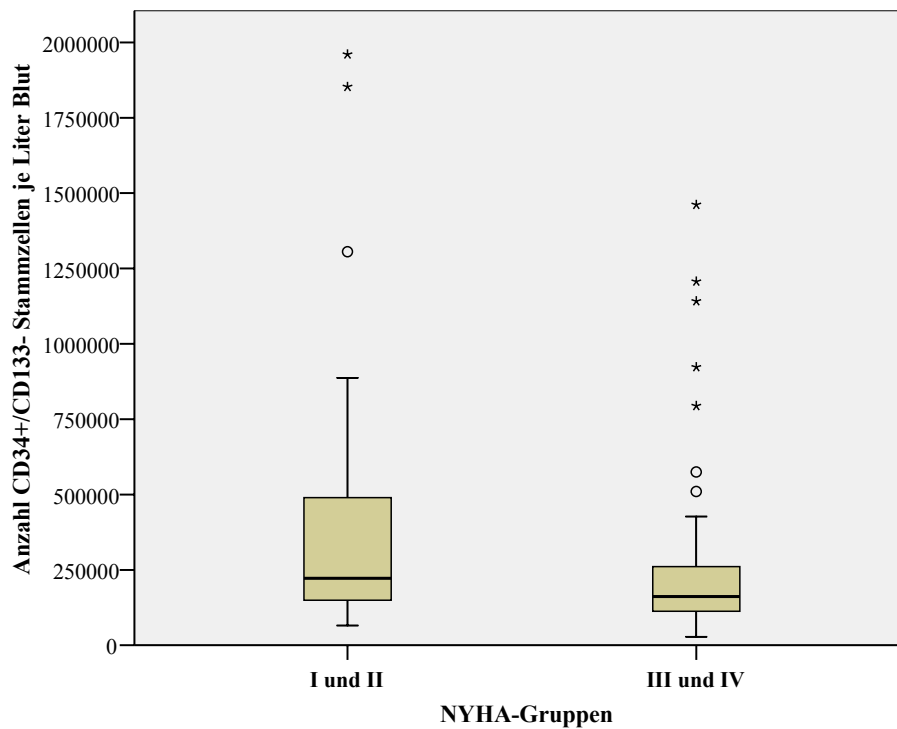
Der Vergleich der Stichprobenwerte zwischen leichter Herzschwäche (NYHA I und II) und den hohen Schweregraden (NYHA III und IV) ergab, dass die Anzahl der CD34+/CD133– Stammzellen bei den leichten Herzinsuffizienzstadien ( $0,43 \pm 0,62$  Zellen/ $\mu$ l Blut) durchschnittlich wesentlich höher war als bei den hohen Schweregraden ( $0,24 \pm 0,25$  Zellen/ $\mu$ l Blut). In Tabelle 12 sind die Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der Gruppen „leichte Herzschwäche“ sowie „schwere Herzinsuffizienz“ gegenübergestellt. In Abbildung 17 sind die Werte zur Anzahl CD34+/CD133– Stammzellen graphisch als Boxplots für jede NYHA-Gruppe dargestellt.

In beiden Gruppen lag keine Normalverteilung vor. Statistisch war der Unterschied der Größenordnungen zwischen den leichten und schweren Formen der Herzschwäche signifikant ( $p = 0,001$ ).

## 6. Ergebnisse

**Tabelle 12:** Überblick über Mittelwert, Median und Standardabweichung der Anzahl von CD34+/CD133– Stammzellen je Liter Blut bei den jeweils zu Paaren zusammengefassten Gruppen NYHA I und II („leichte Herzschwäche“) sowie NYHA III und IV („schwere Herzinsuffizienz“).

CD34+/CD133– Zellen	NYHA I und II „leichte Herzschwäche“	NYHA III und IV „schwere Herzinsuffizienz“
Mittelwert	425.082	235.623
Median	222.200	161.728
Standardabweichung	619.866	248.574



**Abbildung 17:** Graphische Darstellung (Boxplots) der Anzahl von CD34+/CD133– Stammzellen bei der Gegenüberstellung der „leichten Herzschwäche“ (NYHA I und II) und der „schweren Herzinsuffizienz“ (NYHA III und IV).

## 6.6 Anzahl der zirkulierenden CD133+ Zellen

Die CD133+ Zellen sind die Summe aus den primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen sowie der Gesamtheit solcher Zellen, die positiv für CD133 und negativ für CD34 sind. In Tabelle 13 sind die Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der durchflusszytometrisch bestimmten Anzahl CD133+ Zellen je Liter Blut in den NYHA-Gruppen I bis IV sowie insgesamt aufgeführt. In Abbildung 18 sind die Werte graphisch als Boxplots dargestellt.

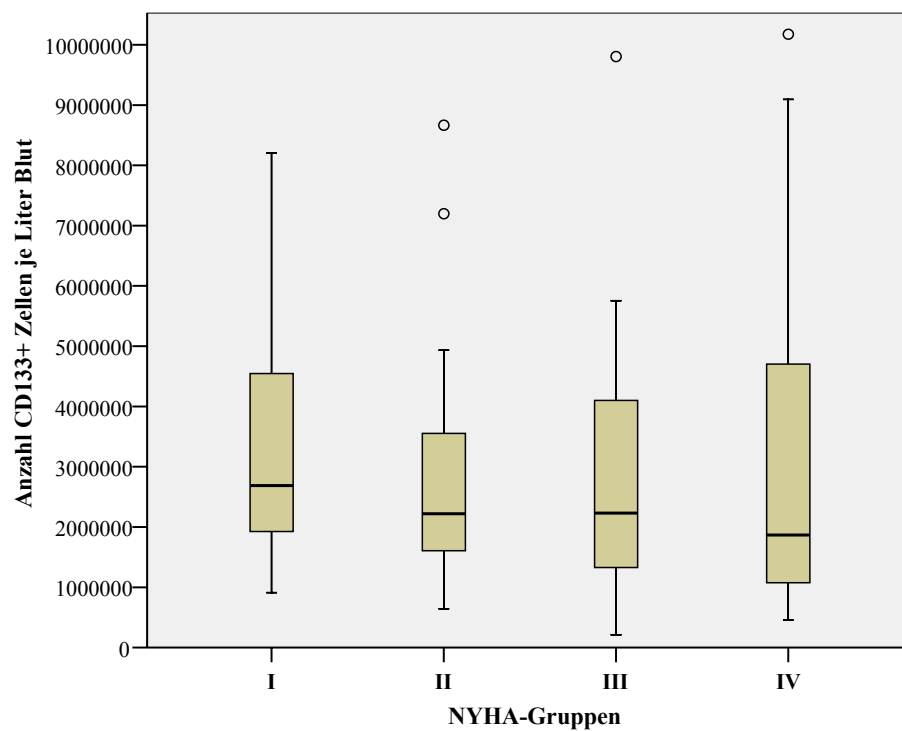
**Tabelle 13:** Überblick über Mittelwert, Median und Standardabweichung der Anzahl von CD133+ Zellen je Liter Blut in den NYHA-Gruppen I bis IV sowie insgesamt.

CD133+ Zellen	NYHA I	NYHA II	NYHA III	NYHA IV	gesamt
Mittelwert	3.728.598	4.377.496	4.877.884	4.765.892	4.437.468
Median	2.689.250	2.221.300	2.231.250	1.866.799	2.252.150
Standardabweichung	3.400.367	10.717.265	7.974.521	7.243.101	7.333.814

Wie aus Tabelle 13 sowie Abbildung 18 ersichtlich, unterscheiden sich die Größenordnungen der CD133+ Zellen zwischen den NYHA-Gruppen im Mittel kaum voneinander. Es war im Mittel ein leichter Anstieg der Zellzahl von NYHA I ( $3,73 \pm 3,40$  Zellen/ $\mu$ l Blut) über NYHA II ( $4,38 \pm 10,72$  Zellen/ $\mu$ l Blut) bis NYHA III ( $4,88 \pm 3,40$  Zellen/ $\mu$ l Blut) und NYHA IV ( $4,77 \pm 3,40$  Zellen/ $\mu$ l Blut) zu beobachten. Insgesamt betrug die Anzahl der CD133+ Stammzellen durchschnittlich  $4,44 \pm 7,33$  Zellen/ $\mu$ l Blut.

Normalverteilung lag nicht vor. Die Unterschiede der CD133+ Zellzahlen zwischen den NYHA-Gruppen waren statistisch nicht zu sichern ( $p = 0,319$ ).

## 6. Ergebnisse



**Abbildung 18:** Graphische Darstellung (Boxplots) der Anzahl CD133+ Zellen je Liter Blut bei herzinsuffizienten Patienten mit den Schweregraden NYHA I bis IV.

## 6. Ergebnisse

### 6.7 Anzahl der zirkulierenden CD133+/CD34–Zellen

Die Analyse der Anzahl CD133+/CD34–Zellen schließt nur solche Zellen ein, die ausschließlich mit dem Antikörper CD133-PE-markiert sind („Upper Left“ aus der Quadrantenstatistik). In Tabelle 14 sind Mittelwert, Median und Standardfehler der CD133+/CD34–Zellen zu jeder NYHA-Gruppe abzulesen. In Abbildung 19 sind die Werte graphisch als Boxplots dargestellt.

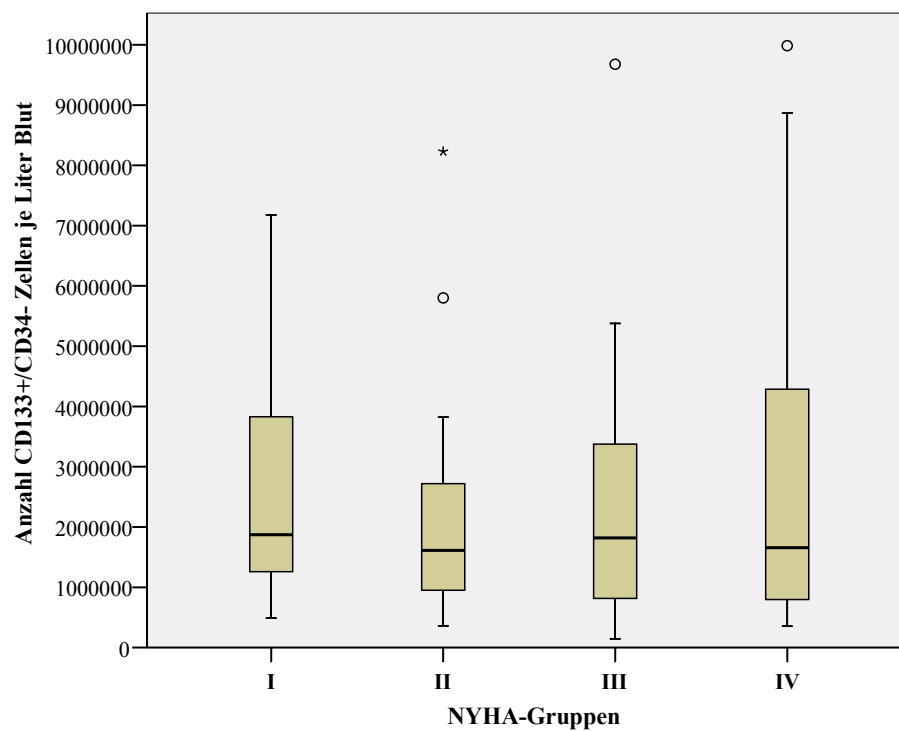
**Tabelle 14:** Überblick über Mittelwert, Median und Standardabweichung der Anzahl von CD133+/CD34– Zellen je Liter Blut in den NYHA-Gruppen I bis IV sowie insgesamt.

CD133+/CD34– Zellen	NYHA I	NYHA II	NYHA III	NYHA IV	gesamt
Mittelwert	3.020.335	3.681.828	4.397.064	4.486.587	3.896.454
Median	1.872.775	1.612.500	1.712.995	1.657.585	1.713.964
Standardabweichung	3.247.698	10.568.652	7.952.191	7.231.933	7.250.119

Die Anzahl der zirkulierenden CD133+/CD34– Zellen unterschied sich kaum zwischen den NYHA-Gruppen. Es war ein leichter Anstieg der 133+/CD34– Zellzahl von NYHA I (3,02 +/- 3,25 Zellen/ $\mu$ l Blut) über NYHA II (3,68 +/- 10,59 Zellen/ $\mu$ l Blut) und NYHA III (4,40 +/- 7,95 Zellen/ $\mu$ l Blut) bis NYHA IV (4,49 +/- 7,23 Zellen/ $\mu$ l Blut) zu erkennen. Im gesamten untersuchten Patientenkollektiv betrug die Anzahl der CD133+/CD34– Stammzellen durchschnittlich 3,90 +/- 7,25 Zellen/ $\mu$ l Blut.

Es lag keine Normalverteilung vor. Statistisch konnte der Anstieg der CD133+/CD34– Zellzahl mit dem Schweregrad der Herzschwäche nicht gesichert werden ( $p = 0,568$ ).

## 6. Ergebnisse



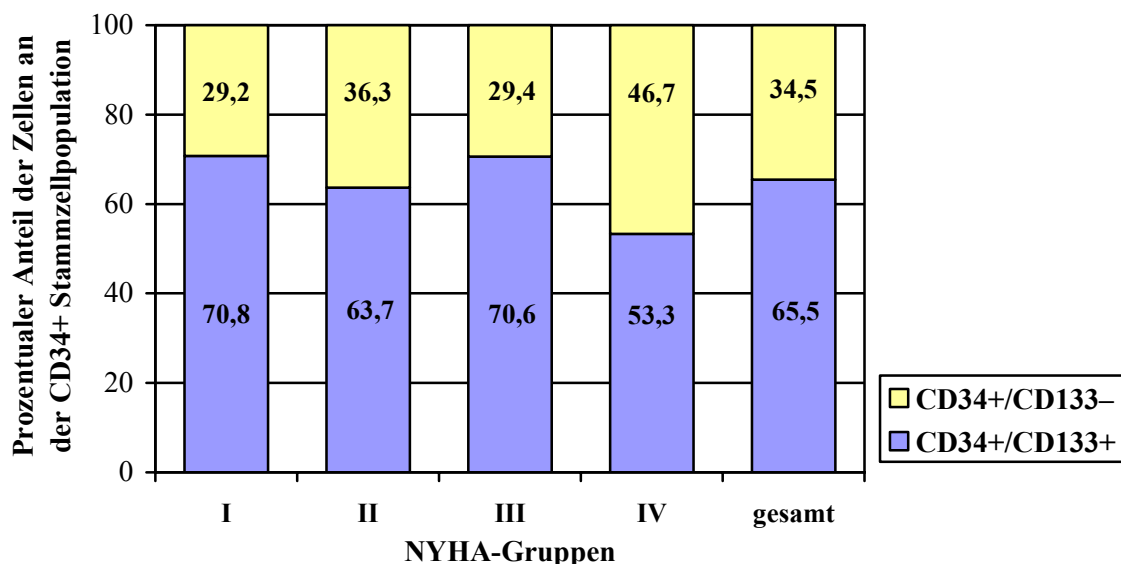
**Abbildung 19:** Graphische Darstellung (Boxplots) der Anzahl CD133+/CD34- Zellen je Liter Blut bei herzinsuffizienten Patienten mit den Schweregraden NYHA I bis IV.



### 6.8 Zirkulierende CD34+ Stammzellen: prozentuale Anteile der CD34+/CD133+ und der CD34+/CD133– Stammzellen

Die Gruppe der CD34+ Stammzellen besteht zum einen Teil aus Zellen, die auch positiv für CD133 sind, und zum anderen Teil aus solchen Zellen, die dieses Antigen nicht tragen. Der prozentuale Anteil von CD34+/CD133+ Stammzellen an den CD34+ Stammzellen betrug durchschnittlich 65,5  $\pm$  17,6 % und war in NYHA IV (53,3  $\pm$  19,9 %) geringer als in NYHA I (70,8  $\pm$  17,0 %), NYHA II (63,7  $\pm$  17,2 %) und NYHA III (70,6  $\pm$  12,0 %). Diese Unterschiede waren statistisch signifikant ( $p_{1,2} = 0,027$ ,  $p_{1,4} < 0,001$ ,  $p_{2,4} = 0,014$ ,  $p_{3,4} < 0,001$ ), nicht aber zwischen den Gruppen NYHA I und III ( $p_{1,3} = 0,287$ ) und NYHA II und III ( $p_{2,3} = 0,063$ ). Der prozentuale Anteil der CD34+/CD133+ Stammzellen an den zirkulierenden CD34+ Stammzellen war in NYHA I um 25 % höher als in NYHA IV. Umgekehrt betrachtet betrug der Anteil der CD34+/CD133– an den CD34+ Zellen im Mittel 34,5  $\pm$  17,6 % und war in NYHA IV (46,7  $\pm$  19,9 %) signifikant höher als in den restlichen Gruppen (NYHA I: 29,2  $\pm$  17,0 %, NYHA II: 36,3  $\pm$  17,2 %, NYHA III: 29,4  $\pm$  12,0 %).

Die Ergebnisse zu den prozentualen Anteilen beider Untergruppen an der CD34+ Stammzellpopulation bei Patienten mit Herzinsuffizienz sind in Abbildung 20 für die NYHA-Gruppen I bis IV sowie insgesamt graphisch dargestellt.



**Abbildung 20:** Graphische Darstellung (gestapeltes Säulendiagramm) der prozentualen Anteile von CD34+/CD133+ und CD34+/CD133– Stammzellen an der CD34+ Stammzellpopulation.

## 6.9 Korrelationen der primitiven Stammzellen

### 6.9.1 Korrelationen der Stammzellzahlen mit den NYHA-Gruppen der Herzschwäche

Mit den NYHA-Gruppen war, bei statistisch hoher Signifikanz, eine mittelstarke negative Korrelation der primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen ( $r = -0,412$ ,  $p < 0,001$ ) sowie der zirkulierenden CD34+ Stammzellen nachzuweisen ( $r = -0,324$ ,  $p < 0,001$ ). Statistisch nicht zu sichern waren die Korrelationen der zirkulierenden CD34+/CD133– Zellen ( $r = -0,143$ ,  $p = 0,057$ ), der CD133+ Zellen ( $r = 0,052$ ,  $p = 0,490$ ) sowie der CD133+/CD34– Zellen ( $r = 0,073$ ,  $p = 0,335$ ) mit den NYHA-Gruppen. Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse im Überblick.

**Tabelle 15:** Überblick über die Korrelationen der zirkulierenden CD34+/CD133+, CD34+, CD34+/CD133–, CD133+ und CD34–/CD133+ Zellen mit den NYHA-Gruppen.

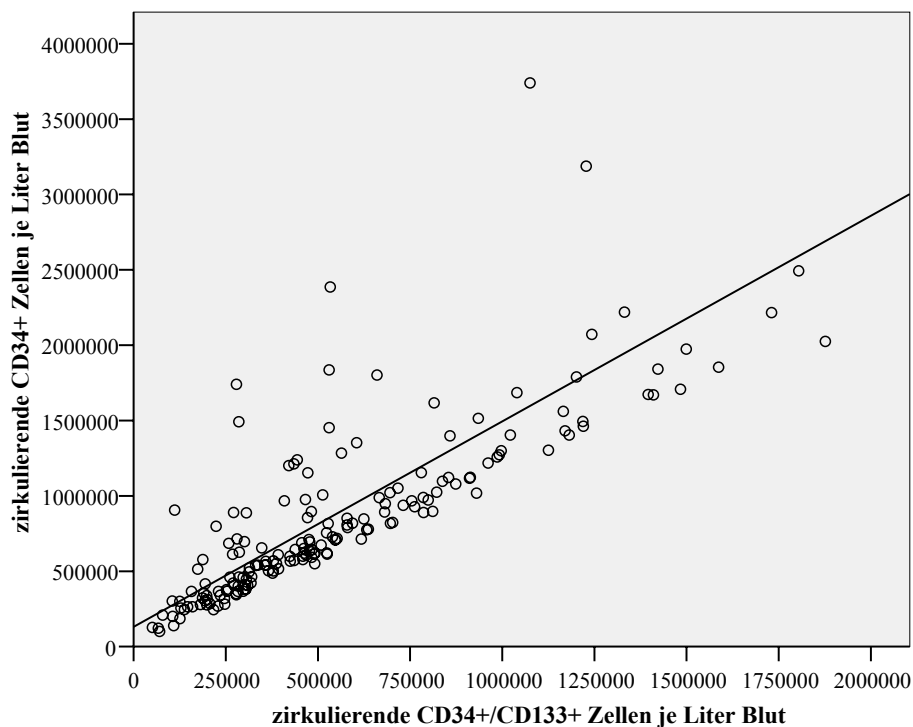
r: Korrelationskoeffizient, p: statistische Überschreitungswahrscheinlichkeit, \*: Wert ist statistisch signifikant.

	Korrelationen mit den NYHA-Gruppen	
zirkulierende Zellen	r	p
CD34+/CD133+	$r = -0,412^*$	$p < 0,001$
CD34+	$r = -0,324^*$	$p < 0,001$
CD34+/CD133–	$r = -0,143$	$p = 0,057$
CD133+	$r = 0,052$	$p = 0,490$
CD133+/CD34–	$r = 0,073$	$p = 0,335$

## 6. Ergebnisse

### 6.9.2 Korrelation der CD34+/CD133+ Stammzellen mit den CD34+ Stammzellen

Die Population der CD34-positiven Stammzellen besteht aus den zirkulierenden CD34+/CD133+ sowie den CD34+/CD133– Zellen. Mit der Anzahl der primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen korrelierten die CD34+ Stammzellen stark positiv ( $r = 0,746$ ), bei statistisch hoher Signifikanz ( $p < 0,001$ ). In Abbildung 21 ist der Zusammenhang von CD34+ und CD34+/CD133+ Stammzellen graphisch als Streu-/Punktediagramm (Scatterplot) dargestellt. Die Stichprobenwerte häuften sich um eine ansteigende Gerade. Diese ist in der Abbildung eingezeichnet und wird Regressionsgerade genannt.



**Abbildung 21:** Regressionsanalyse (Scatterplot) der Korrelation von CD34+ Stammzellen mit den primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen je Liter Blut bei Patienten mit Herzinsuffizienz.

## 6.10 Leukozyten und Lymphozyten im Blut von Patienten mit Herzinsuffizienz

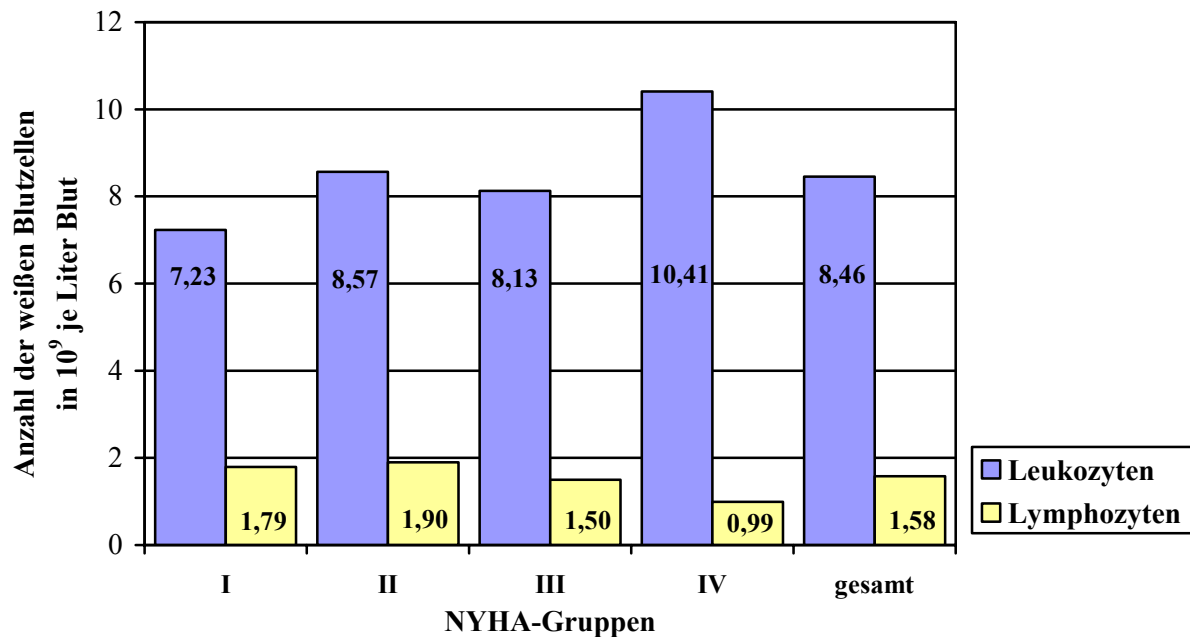
### 6.10.1 Anzahl der Leukozyten und Lymphozyten: NYHA-Gruppen und insgesamt

Die Population der in dieser Arbeit untersuchten CD34+/CD133+ primitiven Stammzellen stellt eine Untergruppe der weißen Blutzellen, genauer gesagt der Lymphozytenfraktion des peripheren Blutes dar. Die Quantität beider Zellgruppen wurde bei allen 178 Patienten des Kollektivs bestimmt. Tabelle 16 gibt einen Überblick über die Mittelwerte beider Zellpopulationen in den vier NYHA-Gruppen des untersuchten Patientenkollektivs sowie insgesamt. In Abbildung 22 sind die Mittelwerte graphisch im gruppierten Säulendiagramm dargestellt.

**Tabelle 16:** Überblick über die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Leukozyten (LEU) und der Lymphozyten (LYM) bei Patienten mit Herzinsuffizienz in den NYHA-Gruppen I bis IV sowie insgesamt. (Einheit:  $10^9/L$ )

Blutzellen	NYHA I	NYHA II	NYHA III	NYHA IV	gesamt
LEU	7,23 $\pm$ 1,86	8,57 $\pm$ 2,03	8,13 $\pm$ 2,40	10,41 $\pm$ 4,17	8,46 $\pm$ 2,82
LYM	1,79 $\pm$ 0,52	1,90 $\pm$ 0,68	1,50 $\pm$ 0,69	0,99 $\pm$ 0,65	1,58 $\pm$ 0,71

## 6. Ergebnisse



**Abbildung 22:** Graphische Darstellung (gruppiertes Säulendiagramm) der Mittelwerte von Leukozyten und Lymphozyten bei Patienten mit Herzinsuffizienz in den NYHA-Gruppen I bis IV sowie insgesamt. Die Zahlen in den Säulen sind die zu jeder NYHA-Gruppe gehörigen Mittelwerte. (Einheit:  $10^9/L$ )

Sowohl die Leukozyten- als auch die Lymphozytenzahlen waren in den Gruppen normal verteilt. Zur weiteren Analyse wurde der T-Test verwendet.

Die durchschnittlichen Leukozytenzahlen waren in NYHA I am niedrigsten ( $7,23 \pm 1,86 \cdot 10^9/L$ ) und in NYHA IV am höchsten ( $10,41 \pm 4,17 \cdot 10^9/L$ ). Im gesamten Kollektiv betrug sie durchschnittlich  $8,46 \pm 2,82 \cdot 10^9/L$ . Die Gruppen NYHA I und II ( $p_{1,2} = 0,002$ ) sowie NYHA III und IV ( $p_{3,4} = 0,010$ ) unterschieden sich statistisch signifikant voneinander. Der leichte Abfall der Leukozytenzahlen zwischen den Gruppen NYHA II ( $8,57 \pm 2,03 \cdot 10^9/L$ ) und III ( $8,13 \pm 2,40 \cdot 10^9/L$ ) war statistisch nicht zu sichern ( $p_{2,3} = 0,329$ ).

Die durchschnittlichen Lymphozytenzahlen betrugen im Gesamtkollektiv im Mittel  $1,58 \pm 0,71 \cdot 10^9/L$ . Sie waren in NYHA IV ( $0,99 \pm 0,65 \cdot 10^9/L$ ) am geringsten. Von NYHA I ( $1,79 \pm 0,52 \cdot 10^9/L$ ) zu NYHA II ( $1,90 \pm 0,68 \cdot 10^9/L$ ) gab es einen leichten Anstieg, statistisch jedoch ohne Signifikanz ( $p_{1,2} = 0,573$ ). Von NYHA II über NYHA III ( $1,50 \pm 0,69 \cdot 10^9/L$ ) hin zu NYHA IV fielen die Lymphozytenzahlen kontinuierlich ab. Die Unterschiede zwischen den Gruppenpaaren NYHA II und III ( $p_{2,3} = 0,005$ ) und NYHA III und IV ( $p_{3,4} < 0,001$ ) waren statistisch signifikant.

## 6. Ergebnisse

### 6.10.2 Leukozyten und Lymphozyten: prozentuale Anteile der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen

Der prozentuale Anteil der CD34+/CD133+ Stammzellen an den Leukozyten nahm mit ansteigender Herzschwäche ab (NYHA I: 0,011 %, NYHA II: 0,008 %, NYHA III: 0,006 %, NYHA IV: 0,003 %). Zwischen den Gruppen NYHA II und NYHA III sowie zwischen NYHA III und NYHA IV waren diese Abfälle statistisch signifikant ( $p_{2,3} = 0,007$ ,  $p_{3,4} < 0,001$ ). Die Gruppen NYHA I und NYHA II ( $p_{1,2} = 0,135$ ) unterschieden sich statistisch nicht signifikant.

Der prozentuale Anteil der primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen an den Lymphozyten veränderte sich dagegen mit Zunahme der Herzschwäche kaum (NYHA I: 0,043 %, NYHA II: 0,038 %, NYHA III: 0,036 %, NYHA IV: 0,043 %). Statistisch war kein signifikanter Unterschied zwischen den vier NYHA-Gruppen nachweisbar ( $p = 0,091$ ).

Die Analyse der prozentualen Anteile von CD34+/CD133+ Stammzellen an den Leukozyten und Lymphozyten bei leichter Herzschwäche der Stadien NYHA I und NYHA II (Leu<sub>1,2</sub>: 0,009 %; Lym<sub>1,2</sub>: 0,040 %) und den schweren Herzschwächeformen der Stadien NYHA III und NYHA IV (Leu<sub>3,4</sub>: 0,005 %; Lym<sub>3,4</sub>: 0,039 %) ergab einen statistisch signifikanten Abfall der CD34+/CD133+ Stammzellzahlen mit Zunahme des Schweregrades der Herzinsuffizienz ( $p_{\text{Leu}} < 0,001$ ,  $p_{\text{Lym}} = 0,021$ ).

Bei der gesamten Stichprobe betrug der prozentuale Anteil der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen an den Leukozyten 0,007 % und an den Lymphozyten 0,039 %. Alle diese Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

**Tabelle 17:** Überblick über die prozentualen Anteile der CD34+/CD133+ Stammzellen +/- Standardabweichung an den Leukozyten (LEU) sowie Lymphozyten (LYM) bei Patienten mit Herzinsuffizienz in den NYHA-Gruppen I bis IV sowie insgesamt. (Angaben in % von LEU bzw. LYM)

% Anteil	NYHA I	NYHA II	NYHA III	NYHA IV	gesamt
% LEU	0,011 +/- 0,007	0,008 +/- 0,005	0,006 +/- 0,004	0,003 +/- 0,002	0,007 +/-
	0,009 +/- 0,006		0,005 +/- 0,004		0,005
% LYM	0,043 +/- 0,027	0,038 +/- 0,024	0,036 +/- 0,028	0,043 +/- 0,055	0,039 +/-
	0,040 +/- 0,025		0,039 +/- 0,040		0,033

### 6.10.3 Korrelationen der Leukozyten und Lymphozyten mit den Stammzellzahlen

Mit den Leukozyten korrelierten die primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen schwach negativ ( $r = -0,112$ ). Dies war statistisch jedoch nicht zu sichern ( $p = 0,136$ ). Auch bei den restlichen untersuchten Zellpopulationen waren die sehr schwachen Korrelationen statistisch nicht signifikant. Mit den Lymphozyten korrelierten die primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen mit mittlerer Stärke positiv ( $r = 0,410$ ,  $p < 0,001$ ), ebenso wie die zirkulierenden CD34+ Stammzellen ( $r = 0,310$ ,  $p < 0,001$ ). Die restlichen Zellpopulationen zeigten nur schwache Korrelationen, die statistisch nicht gesichert werden konnten. In Tabelle 18 sind die Korrelationen der Leukozyten und Lymphozyten mit den Stammzellen zusammengefasst.

**Tabelle 18:** Überblick über die Korrelationen der zirkulierenden CD34+/CD133+, CD34+, CD34+/CD133–, CD133+ und CD34–/CD133+ Zellen mit den Leukozyten (LEU) und mit den Lymphozyten (LYM).

r: Korrelationskoeffizient, p: statistische Überschreitungswahrscheinlichkeit, \*: Wert ist statistisch signifikant.

	Korrelationen mit den weißen Blutzellen			
	LEU		LYM	
zirkulierende Zellen	r	p	r	p
CD34+/CD133+	$r = -0,112$	$p = 0,136$	$r = 0,410^*$	$p < 0,001$
CD34+	$r = -0,109$	$p = 0,148$	$r = 0,310^*$	$p < 0,001$
CD34+/CD133–	$r = -0,068$	$p = 0,365$	$r = 0,124$	$p = 0,100$
CD133+	$r = -0,023$	$p = 0,759$	$r = 0,114$	$p = 0,130$
CD133+/CD34–	$r = -0,018$	$p = 0,813$	$r = 0,095$	$p = 0,208$

## 6.11 BNP-Konzentrationen im Blut von Patienten mit Herzinsuffizienz

### 6.11.1 BNP-Konzentrationen: NYHA-Gruppen und insgesamt

Bei 112 Patienten des untersuchten Kollektivs wurde die BNP-Konzentration im EDTA-Plasma bestimmt, davon bei  $n_1 = 38$  Patienten in NYHA I, bei  $n_2 = 38$  in NYHA II, bei  $n_3 = 24$  in NYHA III und bei  $n_4 = 12$  in der Gruppe NYHA IV. Einen zusammenfassenden Überblick über die Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der BNP-Konzentrationen (pg/ml) in den NYHA-Gruppen I bis IV sowie insgesamt gibt Tabelle 19.

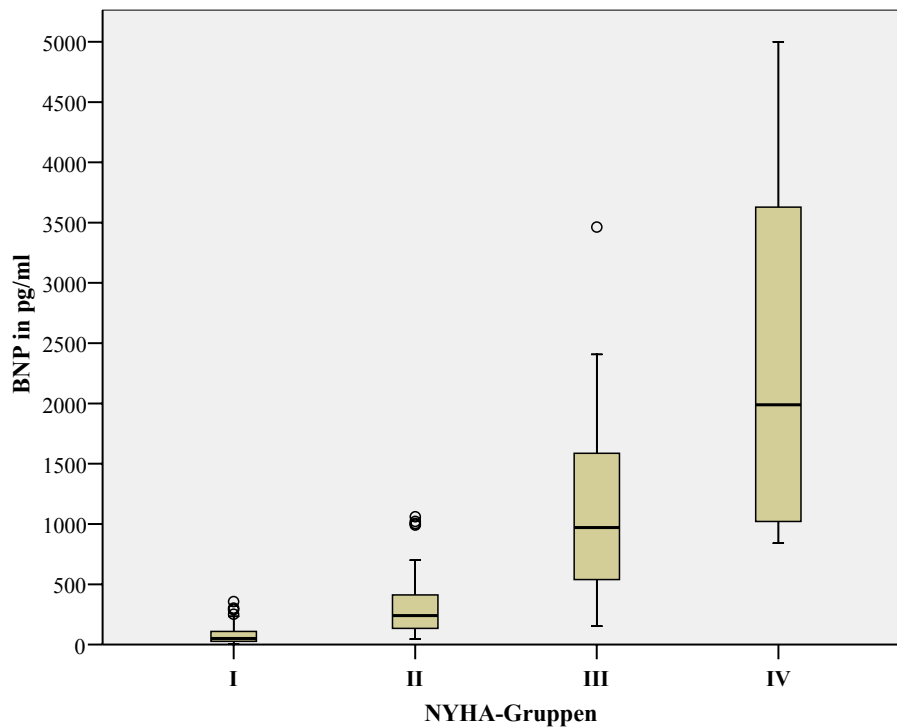
**Tabelle 19:** Überblick über Mittelwert, Median und Standardabweichung der BNP-Konzentrationen bei Patienten mit Herzinsuffizienz in den NYHA-Gruppen I bis IV sowie insgesamt. (Einheit: pg/ml)

BNP (pg/ml)	NYHA I	NYHA II	NYHA III	NYHA IV	gesamt
Mittelwert	85,11	339,45	1145,37	2400,64	992,64
Median	50,93	240,47	971,21	1989,16	812,94
Standardabweichung	91,98	286,38	837,47	1570,88	696,68

Die durchschnittliche BNP-Konzentration im peripheren Blut stieg umso mehr je höher der Schweregrad der Herzinsuffizienz war. In der untersuchten Stichprobe betrug das BNP in der NYHA-Gruppe I durchschnittlich  $85,11 \pm 91,98$  pg/ml, in der NYHA-Gruppe IV dagegen  $2400,64 \pm 1570,88$  pg/ml, was einen deutlichen Anstieg um etwa das 28-Fache vom leichtesten (NYHA I) zum schwersten Grad der Herzschwäche (NYHA IV) darstellt. In Abbildung 23 sind die ermittelten BNP-Werte der vier NYHA-Gruppen graphisch als Boxplots dargestellt. Der Anstieg der BNP-Werte mit dem zunehmenden Schweregrad der Herzschwäche ist deutlich zu erkennen. Im gesamten Kollektiv betrug die BNP-Konzentration durchschnittlich  $992,64 \pm 696,68$  pg/ml.



## 6. Ergebnisse



**Abbildung 23:** Graphische Darstellung (Boxplots) der Höhe der BNP-Konzentrationen (in pg/ml) im peripheren Blut von herzinsuffizienten Patienten mit den Schweregraden NYHA I bis NYHA IV.

Die BNP-Werte waren in den NYHA-Gruppen nicht normal verteilt ( $p < 0,1$ ). Statistisch unterschieden sich die BNP-Konzentrationen des peripheren Blutes signifikant zwischen den Gruppen NYHA I und NYHA II ( $p_{1,2} < 0,001$ ), NYHA II und NYHA III ( $p_{2,3} < 0,001$ ) sowie NYHA III und NYHA IV ( $p_{3,4} = 0,010$ ). Je höher der Schweregrad der Herzschwäche war, umso größer war auch die BNP-Konzentration im peripheren Blut der Patienten.

### 6.11.2 Korrelationen der BNP-Konzentrationen mit den Stammzellenzahlen und mit den NYHA-Gruppen der Herzschwäche

Zwischen dem BNP und der Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen im peripheren Blut bestand eine statistisch hoch signifikante, mittelstarke negative Korrelation ( $r = -0,326$ ,  $p = 0,001$ ). Wie in Abbildung 24 dargestellt, häufen sich die Stichprobenwerte um eine fallende Gerade. Je höher das BNP, desto geringer war die Anzahl der zirkulierenden CD34+/CD133+ Zellen im Blut der herzinsuffizienten Patienten.

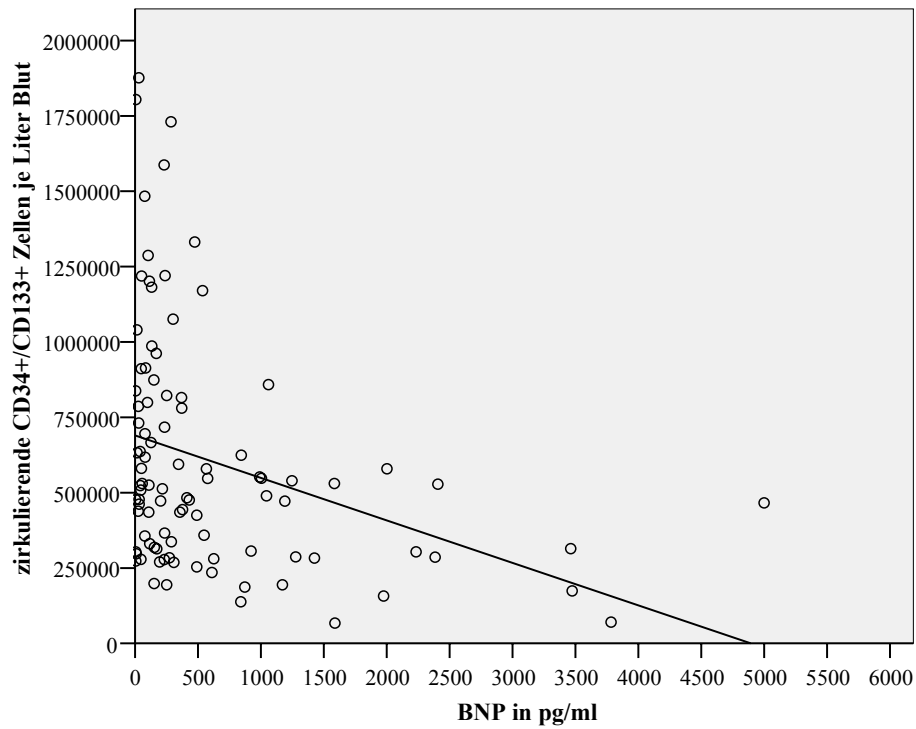
Die zirkulierenden CD34+ Stammzellen korrelierten schwach negativ mit dem BNP ( $r = -0,209$ ). Der statistische Zusammenhang war signifikant ( $p = 0,041$ ). Abbildung 25 zeigt die Korrelation des BNP mit den zirkulierenden CD34+ Zellen graphisch im Scatterplot.

Zwischen dem BNP und den zirkulierenden CD34+/CD133– Zellen ( $r = -0,063$ ,  $p = 0,540$ ), den CD133+ Zellen ( $r = -0,047$ ,  $p = 0,649$ ) sowie den CD133+/CD34–Zellen ( $r = -0,007$ ,  $p = 0,950$ ) des peripheren Blutes waren keine Korrelationen nachweisbar. Mit den NYHA-Gruppen korrelierte das BNP stark positiv ( $r = 0,704$ ,  $p < 0,001$ ). Die Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) und zugehörigen Wahrscheinlichkeitswerte ( $p$ ) der statistischen Zusammenhänge von BNP mit den untersuchten Zellen aus der Lymphozytenfraktion des peripheren Blutes sowie mit NYHA-Gruppen sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

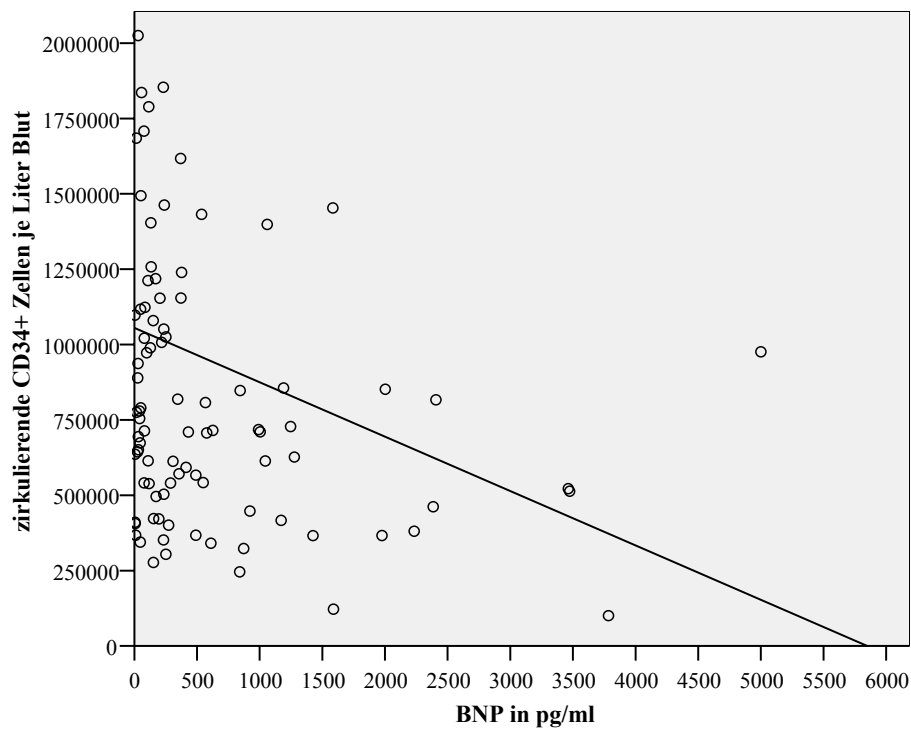
**Tabelle 20:** Überblick über die Korrelationen der BNP-Konzentrationen mit den zirkulierenden CD34+/CD133+, CD34+, CD34+/CD133–, CD133+ und CD34–/CD133+ Zellen und den NYHA-Gruppen.  $r$ : Korrelationskoeffizient,  $p$ : statistische Überschreitungswahrscheinlichkeit, \*: Wert ist statistisch signifikant.

	Korrelationen mit dem BNP	
zirkulierende Zellen	r	p
CD34+/CD133+	$r = -0,326 *$	$p = 0,001$
CD34+	$r = -0,209 *$	$p = 0,041$
CD34+/CD133–	$r = -0,063$	$p = 0,540$
CD133+	$r = -0,047$	$p = 0,649$
CD34–/CD133+	$r = -0,007$	$p = 0,950$
NYHA-Gruppen	$r = 0,704 *$	$p < 0,001$

## 6. Ergebnisse



**Abbildung 24:** Regressionsanalyse (Scatterplot) der Korrelation des BNP (in pg/ml) und den primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen im peripheren Blut von Patienten mit Herzinsuffizienz.



**Abbildung 25:** Regressionsanalyse (Scatterplot) der Korrelation des BNP (in pg/ml) und den CD34+ Stammzellen im peripheren Blut von Patienten mit Herzinsuffizienz.

### 6.12 Nachuntersuchung eines kardial dekompensierten Patienten in NYHA IV nach klinischer Verbesserung seiner Herzleistung zu NYHA II

Es war zu untersuchen, ob sich die Anzahl der im Blut zirkulierenden Stammzellen auch mit Verbesserung der klinischen Herzleistung bei ein und demselben Patienten verändert. Dazu wurde bei einem 47-jährigen Patienten mit hochgradig eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion (Stadium NYHA IV in akuter kardialer Dekompensation) die erste Messung ( $M_1$ ) primitiver Stammzellen durchgeführt. Die Genese der Herzschwäche des Patienten war eine dilatative Kardiomyopathie (DCM), Erstdiagnose 2003. Die Nachuntersuchung ( $M_2$ ) erfolgte 3 Monate später, als sich die Herzleistung desselben Patienten klinisch (zum Herzschwächestadium NYHA II) verbessert hatte. Der untersuchte Patient erhielt während des gesamten Zeitraums keine Statintherapie. Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus oder Niereninsuffizienz lagen nicht vor. Der Nikotinabusus von 5 bis 8 Zigaretten täglich wurde vom Patienten fortgesetzt. In Tabelle 21 sind die gemessenen Leukozyten- und Lymphozytenzahlen, die BNP-Konzentrationen sowie die Anzahl der CD34+/CD133+, CD34+ und CD34+/CD133– Zellen zu beiden Messzeitpunkten  $M_1$  und  $M_2$  zusammengefasst.

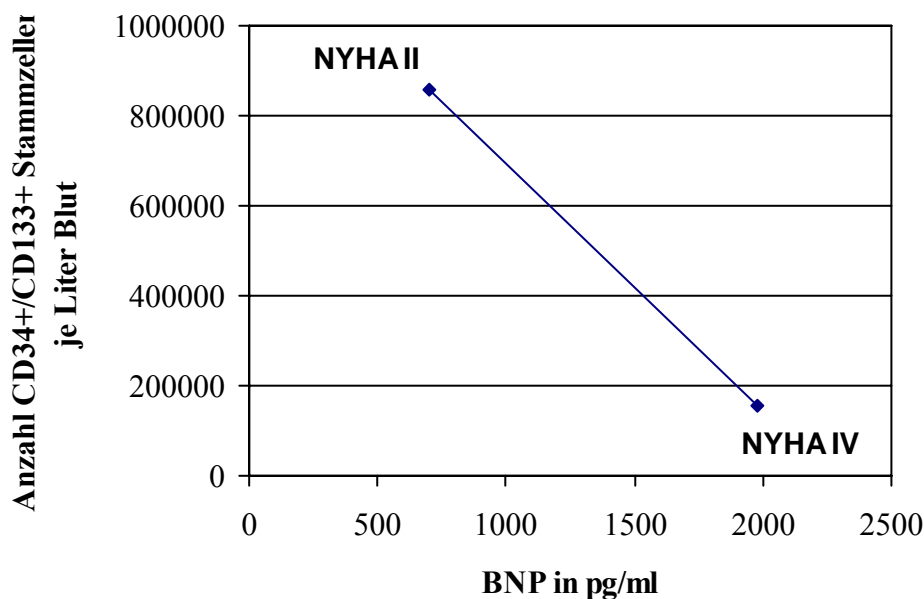
**Tabelle 21:** Übersicht über Leukozyten- (LEU) und Lymphozytenzahlen (LYM), BNP-Konzentrationen und die Anzahl der CD34+/CD133+, CD34+ sowie CD34+/CD133– Stammzellen je Liter Blut beim selben Patienten. Erste Messung ( $M_1$ ) in NYHA IV, Nachuntersuchung ( $M_2$ ) 3 Monate später in NYHA II.

M	NYHA	LEU ( $10^9/L$ )	LYM ( $10^9/L$ )	BNP (pg/ml)	CD34+/CD133+ (Zellen/L)	CD34+ (Zellen/L)	CD34+/CD133– (Zellen/L)
$M_1$	IV	8,35	0,99	1975,97	157.000	366.473	209.413
$M_2$	II	7,23	2,35	700,58	987.000	1.245.500	258.500

Die Anzahl der CD34+/CD133+ primitiven Stammzellen war von 0,16 je  $\mu l$  Blut im Stadium NYHA IV auf 0,99 je  $\mu l$  Blut im Stadium NYHA II angestiegen. Die Anzahl der CD34+/CD133+ Stammzellen hatte sich im Stadium NYHA II im Vergleich zu NYHA IV mehr als versechsfacht.

## 6. Ergebnisse

Die BNP-Konzentration betrug in NYHA IV 1975,97 pg/ml (571,09 pmol/L). Sie sank mit Verbesserung der Herzleistung zu NYHA II um mehr als die Hälfte auf 700,58 pg/ml (202,48 pmol/L) ab. In Abbildung 26 sind die CD34+/CD133+ Stammzellzahlen sowie die BNP-Konzentrationen zu beiden Messzeitpunkten graphisch dargestellt. Darin ist deutlich zu erkennen, dass in NYHA IV eine hohe BNP-Konzentration und niedrige CD34+/CD133+ Stammzellzahlen vorlagen, wogegen in NYHA I eine geringe BNP-Konzentration und hohe CD34+/CD133+ Stammzellzahlen zu beobachten waren.



**Abbildung 26:** Graphische Darstellung (Punktediagramm) der CD34+/CD133+ Stammzellen je Liter Blut und den zugehörigen BNP-Konzentrationen (in pg/ml) in den Herzschwächestadien NYHA II und NYHA IV beim gleichen Patienten. Die Messzeitpunkte waren zeitlich um drei Monate versetzt.

Die Anzahl der CD34+ Stammzellen war im Stadium NYHA II mit 1,25 Stammzellen je  $\mu$ l Blut im Vergleich zur Messung nach kardialer Dekompensation und Stadium NYHA IV mit 0,37 Stammzellen je  $\mu$ l Blut um mehr als das Dreifache erhöht.

Die Anzahl der CD34+/CD133– Stammzellen wies zu beiden Messzeitpunkten keine wesentlichen Unterschiede auf. Im Stadium NYHA IV war sie mit 0,21 Stammzellen je  $\mu$ l Blut nur geringfügig niedriger als im Stadium NYHA II mit 0,26 Stammzellen je  $\mu$ l Blut.

### 7. Diskussion

Seitdem bekannt ist, dass im peripheren Blut adulte Stammzellen zirkulieren, die am Aufbau von neuen Gefäßen beteiligt sind, werden in diese hohe Erwartungen bei der Therapie von ischämischen Erkrankungen gesetzt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde durchflusszytometrisch untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der im Blut zirkulierenden primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen und den verschiedenen Schweregraden der Herzinsuffizienz gibt und ob dieser stadienabhängig ist. Der Stammzellmarker Anti-CD34 ist ein bereits seit langem etablierter Marker von hämatopoetischen sowie endothelialen Stammzellen. Er wurde als einer der ersten Antikörper bei der Suche nach diesen adulten Stammzellen eingesetzt (Krause et al. 1994, Krause et al. 1996, Asahara et al. 1997, Peichev et al. 2000). Da CD34 auch auf frühen zirkulierenden endothelialen Zellen nachgewiesen werden kann (Khan et al. 2005), kommt dem Antikörper Anti-CD133 als Marker der primitiven hämatopoetischen und endothelialen Stammzellen, die frisch ins Blut mobilisiert worden sind, große Bedeutung zu. Die Fähigkeit zur Expression von CD133 geht während der weiteren Differenzierung und Reifung der zirkulierenden CD34+ Stammzellen rasch verloren. Von reifen Blut- und Endothelzellen wird CD133 nicht mehr exprimiert (Yin et al. 1997, Gehling et al. 2000, Peichev et al. 2000). Daher ist die Anzahl der CD34+/CD133+ Stammzellen ein guter Indikator für den Nachschub der wahrscheinlich primitivsten dieser im peripheren Blut zirkulierenden Stammzellen (Schattelman 2005). Die Ergebnisse der durchgeführten Arbeit zeigen einen deutlichen Abfall in der Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen mit dem zunehmenden Schweregrad der Herzinsuffizienz. Die Gruppen NYHA I (0,71  $\pm$  0,39 Zellen/ $\mu$ l Blut) und NYHA II (0,70  $\pm$  0,42 Zellen/ $\mu$ l Blut) wiesen signifikant höhere CD34+/CD133+ Stammzellzahlen auf als die Gruppen NYHA III (0,48  $\pm$  0,31 Zellen/ $\mu$ l Blut) und NYHA IV (0,28  $\pm$  0,20 Zellen/ $\mu$ l Blut). Von den CD34+ Stammzellen waren durchschnittlich 65 % gleichzeitig positiv für CD133. Dieser Anteil war in der Gruppe NYHA I am höchsten, während er in NYHA IV die niedrigsten Werte annahm. Bei Untersuchungen der Stammzellen im Blut von gesunden Probanden waren nur zwischen 26 und 37 % aller CD34+ Stammzellen gleichzeitig positiv für CD133 (Yin et al. 1997). Das lässt vermuten, dass bei Patienten mit Herzinsuffizienz durchschnittlich ein höherer Anteil der im Blut zirkulierenden CD34+ Stammzellen positiv für CD133 ist als bei Gesunden. Verbunden mit

## 7. Diskussion

dem Ergebnis, dass die Anzahl der CD34+/CD133+ Stammzellen mit zunehmendem Schweregrad der Herzschwäche abnimmt, wird deutlich, dass in den hohen NYHA-Stadien offensichtlich ein Mangel an diesen primitiven zirkulierenden Vorläuferzellen vorliegt. Dieser ist möglicherweise auch kausal mit dem zunehmenden Schweregrad der Herzschwäche in Zusammenhang zu bringen. Denkbare Erklärungsmöglichkeiten für die Abnahme der CD34+/CD133+ Stammzellzahlen mit den ansteigenden NYHA-Stadien der Herzschwäche werden in den folgenden fünf Punkten diskutiert:

(1.) Erhöhung des Verbrauchs der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen in den hohen NYHA-Stadien der Herzschwäche.

Die primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen gehören nach der Definition von Hur et al. zur Gruppe der „frühen“ EPC, welche u.a. auch eine Ausgangspopulation der „späten“ EPC darstellt. Die „späten“ EPC wiederum entwickeln sich zu den Endothelzellen von Blutgefäßen (Peichev et al. 2000, Hur et al. 2004). Daneben können sich die CD34+ Stammzellen in Kultur auch direkt in Herzmuskelzellen umwandeln (Müller et al. 2002, Badorff et al. 2003), wobei der Akt-Proteinkinase-3-Signalweg eine bedeutende Rolle zu spielen scheint (Mangi et al. 2003). Bei der Herzinsuffizienz liegt ein Endothelschaden vor (Katz et al. 1999, Chong et al. 2004) und auch die Schädigung der Herzmuskelzellen geht mit ihrer Entwicklung einher (Li et al. 1997). Beides nimmt vermutlich auch mit dem Schweregrad der Herzschwäche zu. Indem neue Endothelzellen aus den zirkulierenden Vorläufern gebildet und die geschädigten Herzmuskelzellen wahrscheinlich durch diese ersetzt werden, steigt mit den NYHA-Stadien vermutlich auch der Verbrauch der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen an. Dadurch sinkt ihre Anzahl im peripheren Blut mit dem zunehmenden Herzschwächestadium ab.

(2.) Störungen der Mobilisation der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen aus dem Knochenmark in den hohen NYHA-Stadien der Herzschwäche.

Es ist bekannt, dass die Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut mobilisiert werden (Shi et al. 1998). Die Anzahl der im Blut zirkulierenden CD34+ Stammzellen wird durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel VEGF, erhöht (Eizawa et al. 2004b). Bei Patienten mit Herzinsuffizienz wurden verminderte Konzentrationen von VEGF im Blut nachgewiesen (Arakawa et al. 2003). Der therapeutische Transfer von VEGF- und SDF-1-Genen führt zu einer erhöhten Expression dieser beiden Wachstumsfaktoren und zeigt außerdem eine Verbesserung der Neovaskulogenese bei ischämischen Herzerkrankungen

## 7. Diskussion

(Kalka et al. 2000, Hiasa et al. 2004). Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass bei der Herzinsuffizienz möglicherweise ein Mangel an endogenen Wachstumsfaktoren, wie etwa VEGF und SDF-1, vorliegt, der auch eine verminderte Mobilisation von CD34+/CD133+ Stammzellen mit sich bringt. Unter der Annahme, dass mit dem ansteigenden Schweregrad der Herzschwäche gleichzeitig auch die Konzentration von Wachstumsfaktoren im Blut abnimmt, lässt sich die Verminderung der CD34+/CD133+ Stammzellzahlen mit den zunehmenden NYHA-Stadien erklären. Es sind weitere Studien nötig, um zu untersuchen, ab welcher Blutkonzentration ein Mangel dieser Wachstumsfaktoren vorliegt, der womöglich Auswirkungen auf die Entstehung bzw. eine Progredienz der Herzinsuffizienz hat und ob auch noch andere Faktoren von Bedeutung sind.

(3.) Verkürzung der Überlebenszeit der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen in den hohen NYHA-Stadien der Herzschwäche.

Untersuchungen zeigen, dass Mäuse mit Herzschwäche bereits im Knochenmark Defekte ihrer CD34+ Stammzellen aufweisen, die sich in verkürzten Überlebenszeiten dieser Zellen äußern (Iversen et al. 2002). Interessanterweise treten kardiovaskuläre Erkrankungen durchaus familiär gehäuft auf (Lloyd-Jones et al. 2004, Murabito et al. 2005). Die genetischen Faktoren scheinen dabei eine besondere Rolle zu spielen. Denkbar sind hier zum Beispiel defekte Regulationsvorgänge in den Apoptose-Genen, wie zum Beispiel der Gene von Bax oder Bcl-2, die auch die Überlebenszeit der primitiven zirkulierenden Stammzellen beeinflussen. Beim programmierten Zelltod ist das Verhältnis aus den Konzentrationen von Bax und Bcl-2 entscheidend. So wird die Apoptose der Zellen durch eine gesteigerte Expression von Bax aktiviert, durch eine Zunahme von Bcl-2 dagegen gehemmt. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz wurden sowohl vermehrte Bax- als auch Bcl-2-Proteinspiegel nachgewiesen (Latif et al. 2000). Entscheidend ist jedoch, dass bei den Herzinsuffizienten eine vergrößerte Bax/Bcl-2-Ratio vorliegt (Moorjani et al. 2007). So dominiert in den hohen NYHA-Stadien vermutlich die Expression der apoptosefördernden Proteine gegenüber der Bildung von apoptosehemmenden Eiweißen. Dies lässt vermuten, dass die Apoptoserate der Zellen bei Patienten mit Herzinsuffizienz erhöht ist. Eine Ursache hierfür könnten mutative Veränderungen in diesen Genen sein. Die veränderten Genexpressionen sind möglicherweise mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz assoziiert und wirken sich auf eine erhöhte Apoptoserate der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen in den hohen NYHA-Stadien aus. Die Expression der Proteine Bax und Bcl-2 kann bei den CD34+ Stammzellen aber auch durch die Wirkung anderer Faktoren beeinflusst werden (Xiao et al.



## 7. Diskussion

2001). Die verkürzten Überlebenszeiten der primitiven Stammzellen könnten daher beispielsweise auch durch die erhöhten Serumkonzentrationen von TNF- $\alpha$  bedingt sein, die bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz beobachtet wurden (Levine et al. 1990). TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, das über sein Effektormolekül Fas ebenfalls die Apoptose von CD34+ Zellen fördert (Maciejewski et al. 1995). Auch unter dem Einfluss von oxidiertem LDL, einem Indikator für oxidativen Stress bei der Herzinsuffizienz (Tsutsui et al. 2002), das auch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) hemmt, wird die Lebenszeit der CD34+/CD133+ Stammzellen verkürzt (Ma et al. 2006). So sinkt ihre Anzahl im peripheren Blut trotz regelrechter Mobilisation aus dem Knochenmark rapide ab. Damit kann auch die Abnahme der Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen in den hohen NYHA-Stadien verbunden sein. In der vorliegenden Arbeit erfolgten keine genetischen Untersuchungen der analysierten Zellen und auch eine Messung der Serumkonzentration von apoptosefördernden Zytokinen wurde nicht durchgeführt. Diese möglichen Einflüsse auf die Überlebenszeiten der primitiven zirkulierenden Stammzellen müssen in weiteren Studien geprüft werden, da sie auch für eine Nutzung in therapeutischen Fragestellungen interessant sein könnten.

(4.) Bevorzugte Differenzierung der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen zu Zellen einer anderen Spezifität in den hohen NYHA-Stadien der Herzschwäche.

Die primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen differenzieren nicht nur zu endothelialen Zellen, sondern auch zu Zellen der hämatopoetischen Reihe (Rafii 2000, Schmeisser und Strasser 2002, Urbich und Dimmeler 2004). Bei der chronischen Herzinsuffizienz ist die Hämatopoese herunter reguliert (Iversen et al. 2002). Nicht davon betroffen scheinen allerdings dendritische Zellen zu sein, die ebenfalls aus den CD34+/CD133+ Stammzellen hervorgehen (de Wynter et al. 1998, Randolph et al. 1998). Die Arbeitsgruppe von Athanassopoulos et al. fand heraus, dass die Anzahl dendritischer Zellen bei Patienten mit Herzinsuffizienz in den schweren Stadien sogar erhöht ist (Athanassopoulos et al. 2004). Unter dem Einfluss von bestimmten Faktoren, wie zum Beispiel GM-CSF und TNF- $\alpha$ , reifen die zirkulierenden CD34+ Stammzellen zu dendritischen Zellen heran (Caux et al. 1992, Reid et al. 1992). VEGF dagegen hemmt ihre Differenzierung (Gabrilovich et al. 1998). Die im Serum von herzinsuffizienten Patienten nachgewiesenen erhöhten Spiegel von TNF- $\alpha$  (Levine et al. 1990) und die verminderten Konzentrationen von VEGF (Arakawa et al. 2003) könnten daher für eine übermäßige Differenzierungsrate der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen zu den dendritischen Zellen in den hohen NYHA-Stadien

## 7. Diskussion

verantwortlich sein. Unter der Annahme, dass mit dem zunehmenden Schweregrad der Herzschwäche die TNF- $\alpha$ -Serumspiegel ansteigen, während die VEGF-Serumspiegel absinken, nimmt die Anzahl der im Blut zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen mit dem Schweregrad ab. Die Anzahl der einzelnen hämatopoetischen Zelltypen ist beim untersuchten Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt worden, so dass keine Rückschlüsse auf Änderungen dieser Zellzahlen mit den NYHA-Stadien möglich sind. Es sind weitere Studien nötig, um die Differenzierungswege der primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen sowie deren Einflussfaktoren genauer zu erforschen. Dabei könnten auch Angriffspunkte für gerichtete Interventionsmöglichkeiten gefunden werden, die möglicherweise auch therapeutisch nutzbar sind.

(5.) Andere Ursachen, welche die Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen vermindern und zugleich in den hohen NYHA-Stadien der Herzinsuffizienz vermehrt auftreten.

Es ist nicht auszuschließen, dass der in der vorliegenden Arbeit beobachtete, umgekehrte Zusammenhang zwischen der Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen und den verschiedenen NYHA-Schweregraden der Herzschwäche zusätzlich durch andere Ursachen beeinflusst wird. Das in der durchgeführten Studie untersuchte Kollektiv von Patienten war bezüglich seiner Begleiterkrankungen unselektiert. Ausgewertet wurde das Vorhandensein von Diabetes mellitus sowie Niereninsuffizienz. Mit dem ansteigenden Schweregrad der Herzschwäche nahm die Häufigkeit dieser Komorbiditäten zu. Auch das Lebensalter und die BNP-Konzentrationen des peripheren Blutes stiegen mit dem Herzschwächestadium signifikant an. Alle diese Faktoren sind bekannt dafür, mit erniedrigten Zahlen von zirkulierenden endothelialen Stammzellen einherzugehen (Tepper et al. 2002, Choi et al. 2004, Loomans et al. 2004, Kusuyama et al. 2006, Shaffer et al. 2006). Deshalb muss bedacht werden, dass jeder Einzelne dieser Faktoren sowie weitere, welche in der Studie nicht untersucht wurden, ebenfalls an der Abnahme der Anzahl von primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen im peripheren Blut in den hohen NYHA-Stadien beteiligt sein könnten. Um die Wirkungen solcher Faktoren besser einschätzen zu können, sind zukünftig weitere Studien nötig. Dabei erscheinen zum Beispiel auch die Einflüsse von verschiedenen Tumoren, welche die Gefäßbildung anregen (Carmeliet 2000), auf die Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen interessant, ebenso wie die Wirkungen von Medikamenten, wie beispielsweise Lithium, bei dem gezeigt wurde, dass es die Differenzierung von embryonalen Stammzellen negativ beeinflusst (Schmidt et al. 2001).

## 7. Diskussion

Zur Verbesserung der Diagnostik der Herzinsuffizienz ist es denkbar, zukünftig die Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden primitiven Stammzellen bei den Patienten zu bestimmen, um damit den Schweregrad der Herzschwäche zu beurteilen. Dabei stellt sich die Frage, welche Phänotypen adulter Stammzellen, die im peripheren Blut zirkulieren, wohl geeignet sind, sichere Aussagen über den Schweregrad der Herzinsuffizienz zu treffen. Die Messung der Anzahl von CD34+/CD133+ Stammzellen eignet sich, den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nach zu urteilen, gut für eine Differenzierung zwischen den leichten (NYHA I und II) und schweren NYHA-Stadien (NYHA III und IV) der Herzschwäche. Die signifikante negative Korrelation der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen mit den NYHA-Gruppen zeigt, dass es einen umgekehrten Zusammenhang zwischen den CD34+/CD133+ Stammzellzahlen und den Schweregraden der Herzinsuffizienz gibt ( $r = -0,412$ ,  $p < 0,001$ ). Bestärkt wird dieser Zusammenhang dadurch, dass die Konzentration des Herzinsuffizienzmarkers BNP, welcher als wichtige Messgröße bei der Diagnostik sowie der Verlaufskontrolle der Herzschwäche etabliert ist, in den durchgeführten Untersuchungen ebenfalls negativ mit der Anzahl der im Blut zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen korreliert ( $r = -0,326$ ,  $p = 0,001$ ). Mittels Quantifizierung der CD34+/CD133+ Stammzellen ist eine Abstufung zwischen den Stadien NYHA I/II, NYHA III und NYHA IV möglich. Um das Voranschreiten einer bestehenden chronischen Herzschwäche von den leichten zu den schweren Stadien zu erkennen, ist die Messung der CD34+/CD133+ Stammzellen daher wahrscheinlich gut geeignet. Die Stadien NYHA I und NYHA II können anhand der CD34+/CD133+ Stammzellzahlen jedoch nicht eindeutig voneinander unterschieden werden. Zur Klassifizierung der Herzschwäche müssen definierte Grenzen der Anzahl von im Blut zirkulierenden Stammzellen für jeden Schweregrad festgelegt werden. Dabei sollten auch individuelle Faktoren, wie z.B. die Begleiterkrankungen oder das Lebensalter der Patienten, bedacht werden. Hierfür sind weiterführende Studien notwendig.

Neben der Anzahl der primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen erfolgte in der vorliegenden Arbeit auch die Messung der im Blut zirkulierenden CD34+, CD34+/CD133-, CD133+ sowie CD133+/CD34- Stammzellen bei den herzinsuffizienten Patienten. Die Möglichkeiten mit diesen verschiedenen charakterisierten Zelltypen eine Differenzierung zwischen den verschiedenen Schweregraden der Herzinsuffizienz vorzunehmen, werden im Folgenden einzeln diskutiert:

Die Ergebnisse zur Anzahl der CD34+ Stammzellen zeigten überwiegend einen umgekehrten Zusammenhang mit den Schweregraden der Herzschwäche. Dabei verringerten sich CD34+

## 7. Diskussion

Zellzahlen kontinuierlich ab dem Stadium NYHA II. Von NYHA I zu NYHA II war dagegen ein leichter Anstieg zu beobachten. Ein Vergleich der hohen Schweregrade (NYHA III und IV) mit den niedrigen Stadien der Herzschwäche (NYHA I und II) ergab signifikant geringere CD34+ Stammzellzahlen in NYHA III und IV als in NYHA I und II. Dieses Ergebnis wird von der Arbeitsgruppe von Valgimigli et al. unterstützt, die ebenfalls die Anzahl von CD34+ Stammzellen bei Patienten mit Herzschwäche der unterschiedlichen NYHA-Schweregrade untersuchten. Sie beschrieben einen kontinuierlichen Abfall der CD34+ Stammzellzahlen von NYHA I ( $4,9 \pm 2,0$  Zellen/ $\mu$ l Blut) über NYHA II ( $3,3 \pm 1,5$  Zellen/ $\mu$ l Blut) und NYHA III ( $2,4 \pm 0,9$  Zellen/ $\mu$ l Blut) hin zu NYHA IV ( $1,7 \pm 1,0$  Zellen/ $\mu$ l Blut). Die Gruppe verglich außerdem die Anzahl der CD34+ Stammzellen von herzinsuffizienten Patienten mit denen einer gesunden Kontrollgruppe. Dabei zeigten sich höhere Stammzellzahlen in den Stadien NYHA I und NYHA II als bei den Untersuchten ohne bestehende Herzschwäche. Valgimigli et al. diskutierten ihre Ergebnisse als eine vermehrte Mobilisation der CD34+ Stammzellen aus dem Knochenmark als Antwort auf eine überwältigende Aktivierung der Stammzellfreisetzung in den frühen NYHA-Stadien, die von NYHA I zu NYHA II folglich abnimmt (Valgimigli et al. 2004). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben dagegen einen leichten Anstieg der CD34+ Stammzellzahl vom Stadium NYHA I zu NYHA II, der statistisch jedoch keine Signifikanz erreichte. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass die CD34+ Stammzellzahlen in den Gruppen NYHA I und NYHA II den physiologischen Schwankungen unterliegen und sich praktisch nicht wesentlich in ihren Größenordnungen voneinander unterscheiden. Möglicherweise sind in diesen beiden Stadien sowohl die Mobilisation der CD34+ Stammzellen aus dem Knochenmark als auch ihr Verbrauch in der Peripherie annähernd gleich groß. Daraus lässt sich ableiten, dass mit der alleinigen Messung der CD34+ Stammzellzahlen ebenfalls keine Differenzierung zwischen den Herzschwächestadien NYHA I und NYHA II möglich ist. Es ist anzumerken, dass die von Valgimigli et al. gemessenen Zahlen zirkulierender CD34+ Stammzellen im Durchschnitt wesentlich höher waren als die Zahlen in der vorliegenden Arbeit. Dafür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten: Die Arbeitsgruppe von Valgimigli et al. bezog zum Beispiel einen Anteil von durchschnittlich 15 % weiblicher Probanden in die Studie ein. Durch die höheren Östrogenkonzentrationen im Blut ist die Anzahl der zirkulierenden gefäßbildenden Stammzellen bei Frauen bereits physiologisch höher als bei Männern (Strehlow et al. 2003). Um diesen Einfluss der Östrogene auf die Stammzellzahlen auszuschließen, sind in der durchgeführten Studie nur männliche Patienten mit Herzinsuffizienz untersucht worden. Der Östrogeneinfluss durch den

## 7. Diskussion

mit untersuchten Frauenanteil im Patientenkollektiv von Valgimigli et al. kann daher durchaus für die höhere Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+ Stammzellen in ihren Ergebnissen verantwortlich gemacht werden. Eine weitere mögliche Ursache für die unterschiedlichen Messwerte ist die Nutzung von verschiedenen Messmethoden beider Gruppen. Problematisch hierbei ist, dass es zur Zeit immer noch kein einheitliches Protokoll zur Probenvorbereitung für die im Blut zirkulierenden gefäßbildenden Stammzellen gibt (Levering et al. 2007). Die Auswahl an Protokollen zur Messung der Anzahl dieser CD34+ Stammzellen ist sehr vielfältig (Brando et al. 2000, Shaffer et al. 2006). Die Ergebnisse zur Anzahl der am Durchflusszytometer untersuchten Stammzellen können sich protokollabhängig voneinander unterscheiden, sie korrelieren bei der Nutzung gleicher Antikörper jedoch meist gut miteinander (Gajkowska et al. 2006). Insbesondere die Verwendung verschiedener Pufferlösungen, die Reihenfolge von Wasch- und Lyseprozeduren sowie das Gaten der Zellpopulationen für die Erstellung des Analysefensters können Unterschiede bei den gemessenen Zellzahlen verursachen (Cabezudo et al. 1999). In Zukunft sollte weiterhin die Etablierung von einheitlichen und besonders auch Zeit und Kosten sparenden Messmethoden für die Quantifizierung der zirkulierenden gefäßbildenden Stammzellen im peripheren Blut angestrebt werden, die einen routinemäßigen Einsatz mit hoher Validität ermöglicht.

Für die sinkenden CD34+ Stammzellzahlen von NYHA II hin zu den Stadien NYHA III und NYHA IV sind die gleichen Erklärungsansätze wie für die Abnahme der CD34+/CD133+ Stammzellzahlen mit ansteigendem Schweregrad der Herzschwäche, die bereits in den Punkten (1.) bis (5.) diskutiert wurden, anwendbar.

Ein Vergleich der zirkulierenden CD34+ mit den primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen bezüglich ihrer Aussagekraft bei der Differenzierung zwischen den verschiedenen NYHA-Schweregraden der Herzschwäche zeigt Folgendes: Im gesamten Patientenkollektiv war durch beide Stammzelltypen eine gute Differenzierung zwischen den leichten (NYHA I und II) und den schweren Stadien der Herzinsuffizienz (NYHA III und IV) mit statistisch hoher Signifikanz ( $p < 0,001$ ) gegeben. Eine Unterscheidung zwischen den Stadien NYHA I und NYHA II war durch die Messung beider Stammzelltypen statistisch allerdings nicht sicher möglich ( $p = 0,739$  und  $p = 0,413$ ) und kann daher zukünftig wohl in der Diagnostik keine Anwendung finden. Die CD34+ Stammzellen haben eine mittelstarke negative Korrelation mit den NYHA-Gruppen ( $r = -0,324$ ,  $p < 0,001$ ) und korrelieren auch mit den BNP-Konzentrationen des peripheren Blutes negativ ( $r = -0,209$ ;  $p = 0,041$ ). Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Arbeitsgruppe von Valgimigli et al. überein, die ebenfalls einen

## 7. Diskussion

mittelstarken, negativen statistischen Zusammenhang der Anzahl der CD34+ Stammzellen mit den NYHA-Gruppen ( $r = -0,40$ ,  $p < 0,01$ ) sowie den BNP-Konzentrationen ( $r = -0,54$ ;  $p < 0,02$ ) im Blut der herzinsuffizienten Patienten nachwiesen (Valgimigli et al. 2004). Ein etwas stärkerer statistischer Zusammenhang als bei den zirkulierenden CD34+ Stammzellen war in der vorliegenden Arbeit zwischen der Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen und den NYHA-Gruppen sowie den BNP-Konzentrationen des peripheren Blutes festzustellen. Dabei ist zu bemerken, dass die Ergebnisse zur guten positiven Korrelation der BNP-Konzentrationen mit den NYHA-Gruppen, bei signifikanter Zunahme des BNP mit ansteigendem NYHA-Stadium, mit den Ergebnissen anderer Veröffentlichungen übereinstimmen (Brunner-La Rocca 2003, Müller et al. 2004, Weber und Hamm 2006). Da die CD34+/CD133+ Stammzellen stärker mit den Schweregraden sowie dem klassischen Marker der Herzinsuffizienz, dem BNP, korrelieren als die CD34+ Stammzellen, scheint die Messung der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen für die Beurteilung der Schweregrade eine bessere Aussagekraft zu haben. Möglicherweise liegt dies darin begründet, dass durch die zusätzliche Nutzung des Antikörpers CD133 nur die primitiven CD34+ Stammzellen des Blutes gemessen werden, wohingegen ohne Anti-CD133 eine weitaus unselektiertere Population von zirkulierenden CD34+ Zellen erfasst wird.

Die CD34+ Stammzellpopulation besteht aus CD34+/CD133+ und CD34+/CD133– Stammzellen. Steigt die Anzahl der CD34+ Stammzellen von NYHA I zu NYHA II an während die der CD34+/CD133+ Stammzellen abnimmt, dann muss die Anzahl der CD34+/CD133– Stammzellen in NYHA I und NYHA II zunehmen. Dieses Ergebnis ergaben auch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. Dabei war die durchschnittliche Anzahl der CD34+/CD133– Stammzellen in NYHA II ( $0,44 \pm 0,41$  Zellen/ $\mu$ l Blut) am höchsten, während in NYHA III ( $0,19 \pm 0,15$  Zellen/ $\mu$ l Blut) die niedrigsten Werte zu beobachten waren. Zwischen den Gruppen NYHA I ( $0,41 \pm 0,79$  Zellen/ $\mu$ l Blut) und NYHA II sowie zwischen NYHA III und NYHA IV ( $0,30 \pm 0,35$  Zellen/ $\mu$ l Blut) erreichten die Unterschiede der CD34+/CD133– Stammzellzahlen statistisch keine Signifikanz ( $p = 0,053$  und  $p = 0,470$ ). Das deutet darauf hin, dass mit der Messung der CD34+/CD133– Stammzellzahlen im peripheren Blut zwar eine Unterscheidung zwischen den hohen und den geringeren Schweregraden der Herzschwäche möglich ist, nicht aber zwischen NYHA I und II sowie zwischen NYHA III und IV. Die Gruppe der CD34+/CD133– Zellen besteht aus den reiferen Stammzellen, welche die Fähigkeit zur Expression von CD133 bereits verloren haben. Sie enthalten neben den „späten“ EPC auch die lymphoiden und die myeloiden Stammzellen des Blutes, die ebenfalls zu einem Teil aus den CD34+/CD133+ Stammzellen hervorgehen

## 7. Diskussion

(Jaatinen et al. 2006). Außerdem umfassen sie auch die frühen endothelialen Zellen, die im Blut zirkulieren (Khan et al. 2005) und bei denen die Expression von CD34 langsam herunterreguliert wird. Ihre Anzahl ist besonders nach einem akuten Myokardinfarkt (Mutin et al. 1999, Shintani et al. 2001), bei Angina-pectoris (Hladovec et al. 1978) sowie nach Gefäßverletzungen (Bouvier et al. 1970) erhöht. Kongruent zu den CD34+/CD133+ Stammzellen hatte die CD34+/CD133- Zellpopulation an den CD34+ Stammzellen im Gesamtkollektiv einen durchschnittlichen Anteil von 35 %. Dieser war in NYHA I am geringsten und in NYHA IV am höchsten. Zwischen den CD34+/CD133- Zellen und den NYHA-Gruppen bestand nur eine schwache, negative Korrelation, die statistisch nicht gesichert werden konnte ( $r = -0,143$ ,  $p = 0,057$ ). Ein klarer stadienabhängiger Zusammenhang war nicht zu erkennen, sondern ein triphasisches Verhalten. Der Anstieg der CD34+/CD133- Zellzahl von NYHA I zu NYHA II könnte mit dem erhöhten Endothelschaden und der damit verbundenen Mobilisation von CD34+/CD133- Zellen ins periphere Blut erklärt werden. Der Abfall von NYHA II zu NYHA III lässt vermuten, dass hier ein erhöhter Einbau der CD34+/CD133- Zellen ins Endothel vorliegt oder aber ein Mangel an Vorläuferzellen, der eine ausreichende Heranreifung zu den CD34+/CD133- Zellen verhindert. Das Wiederansteigen von NYHA III zu NYHA IV könnte damit zusammenhängen, dass die CD34+/CD133- Zellen möglicherweise eine gestörte Adäsion zum Endothel aufweisen oder sie aufgrund des erhöhten Endothelschadens in NYHA IV wieder vermehrt mobilisiert werden, so dass folglich die Anzahl der im Blut zirkulierenden CD34+/CD133- Zellen in NYHA IV zunimmt. Mit der Messung von zirkulierenden CD34+/CD133- Zellzahlen werden wahrscheinlich eher solche Stammzellen erfasst, deren Potenz zur Differenzierung aufgrund ihres fortgeschrittenen Reifungsgrades bereits vermindert ist. Für eine Unterscheidung zwischen den Schweregraden der Herzinsuffizienz scheint die Quantifizierung der CD34+/CD133- Zellen nicht geeignet zu sein.

Die Messungen der Anzahl von im peripheren Blut zirkulierenden CD133+ Zellen bei Patienten mit Herzinsuffizienz unterschiedlicher Schweregrade ergaben, dass sich die CD133+ Zellzahlen nicht mit dem Schweregrad der Herzschwäche verändern ( $p = 0,319$ ). Mit den NYHA-Gruppen bestand statistisch keine Korrelation ( $r = 0,052$ ,  $p = 0,490$ ). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Anzahl der zirkulierenden CD133+ Zellen vermutlich nicht mit den NYHA-Schweregraden der Herzschwäche in Zusammenhang zu bringen ist. In der Literatur werden CD133+ Zellen meist mit weiteren Antikörpern, wie zum Beispiel CD34, VEGFR-2 oder CXCR-4 markiert. Die alleinige Nutzung von Anti-CD133 scheint für die Einschätzung des Schweregrades bei der Herzinsuffizienz nicht von entscheidender

## 7. Diskussion

Bedeutung zu sein. Durchschnittlich 77 % der CD133+ Zellen waren negativ für CD34. Die CD133+/CD34- Zellen wurden neben den CD34+ Stammzellen als eine im peripheren Blut zirkulierende Zellpopulation beschrieben, die eine Ausgangspopulation von CD34+/CD133+ Stammzellen darstellen und im Vergleich zu diesen Zellen auch eine höhere Potenz zur Neovaskulogenese besitzen sollen (Nakamura et al. 1999, Gallacher et al. 2000, Friedrich et al. 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch auch bei der Anzahl der CD133+/CD34- Zellen keine statistisch repräsentativen Unterschiede zwischen den NYHA-Schweregraden der Herzinsuffizienz ( $p = 0,568$ ) und auch eine Korrelation mit den NYHA-Gruppen konnte nicht nachgewiesen werden ( $r = 0,073$ ,  $p = 0,335$ ). Eine mögliche Erklärung für diese kontroversen Ergebnisse könnte sein, dass in vivo nur ein sehr kleiner Teil dieser CD133+/CD34- Zellen zu den CD34+/CD133+ Stammzellen differenziert. Von den Schweregraden der Herzinsuffizienz scheint dieser Differenzierungsweg nicht wesentlich beeinflusst zu werden. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um mehr Klarheit in die Differenzierungswege dieser im peripheren Blut zirkulierenden Stammzellen und ihren Nutzen in vivo zu bringen.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Stammzellzahlen bei einem herzinsuffizienten Patienten nach akuter kardialer Dekompensation im Stadium NYHA IV sowie ein zweites Mal nach klinischer Verbesserung seiner Herzleistung zu NYHA II zeigten einen deutlichen Anstieg der CD34+ Stammzellen um mehr als 300 % sowie der CD34+/CD133+ Stammzellen um mehr als 600 % im Vergleich zum ersten Messwert. Keine Veränderungen waren hingegen bei der Anzahl der CD34+/CD133- Stammzellzahlen zu beobachten. Die CD133+ sowie CD133+/CD34- Stammzellzahlen wurden aufgrund ihrer Stadienunabhängigkeit im Gesamtkollektiv nicht ausgewertet. Die gewonnenen Ergebnisse lassen vermuten, dass die Quantifizierung der primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen auch für Aussagen zur Verlaufskontrolle bei der Herzinsuffizienz geeignet sind. Da sich ihre Anzahl mit der Verbesserung des NYHA-Stadiums des Patienten in einem weitaus höheren Maße verändert als die der CD34+ Stammzellen, erscheint die Aussagekraft der CD34+/CD133+ Stammzellzahlen der von CD34+ Stammzellzahlen überlegen zu sein. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Anzahl der CD34+/CD133+ Stammzellen möglicherweise sensitiver auf eine Veränderung der Herzleistung reagiert als die der CD34+ Stammzellen. Daher ist es denkbar, dass die Messung der CD34+/CD133+ Stammzellzahlen zukünftig auch in der Verlaufskontrolle der Herzinsuffizienz Anwendung finden könnte. Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann auf Grund der kleinen Stichprobe allerdings kein Beweis dafür erbracht werden. Um dies zu prüfen, sind zukünftig weitere Studien nötig,



## 7. Diskussion

um hierzu Untersuchungen an einem größeren Kollektiv herzinsuffizienter Patienten durchführen.

In den letzten Jahren wurde zunehmend auch anderen Markern als Anti-CD34 und Anti-CD133 Aufmerksamkeit geschenkt. Untersuchungen zeigen, dass es unter ischämischen Bedingungen zu einer hypoxiebedingten Induktion des Transkriptionsfaktors HIF-1 in den Endothelzellen kommt, wodurch eine vermehrte Bildung des Chemokins SDF-1 induziert wird (Ceradini et al. 2004, De Falco et al. 2004) und es zeitverzögert auch zur Bildung und Ausschüttung des Wachstumsfaktors VEGF kommt (Forsythe et al. 1996, Sang et al. 2000). VEGF fördert über seinen Rezeptor VEGFR-2 die Angio- und Vaskulogenese. Dabei werden vermehrt EPC aus dem Knochenmark freigesetzt (Asahara et al. 1999), das Überleben, die Migration und die Differenzierung der endothelialen Zellen wird erhöht (Matsumoto und Claesson-Welsh 2001) und auch die Durchblutung des Myokards verbessert (Carmeliet et al. 1999). Untersuchungen zur Anzahl von zirkulierenden CD34+/CD133+/VEGFR-2+ Zellen bei Patienten mit Herzinsuffizienz unterschiedlicher NYHA-Stadien lassen einen kontinuierlichen Abfall der Anzahl dieser dreifach positiven Stammzellen mit dem zunehmenden Schweregrad der Herzschwäche erkennen. Die Anzahl der zirkulierenden CD34+ Stammzellen korreliert dabei statistisch stark positiv mit der von CD34+/CD133+/VEGFR-2+ Zellen ( $r = 0,79$ ,  $p < 0,001$ ) (Valgimigli et al. 2004). Auch bei Gesunden besteht statistisch ein positiver Zusammenhang zwischen der Anzahl von CD34+ und CD34+/CD133+/VEGFR-2+ Stammzellen im peripheren Blut ( $r = 0,53$ ,  $p < 0,001$ ). Die CD34+/CD133+ Stammzellen korrelieren bei Gesunden ebenfalls stark positiv mit den CD34+ Stammzellen ( $r = 0,86$ ,  $p < 0,001$ ) und auch mit den CD34+/CD133+/VEGFR-2 Stammzellen haben sie einen positiven statistischen Zusammenhang ( $r = 0,55$ ,  $p < 0,001$ ) (George et al. 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die starke positive Korrelation zwischen der Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen und den CD34+ Stammzellen ( $r = 0,75$ ,  $p < 0,001$ ) auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz. Es wird deutlich, dass die Abnahme der Stammzellzahlen mit den verschiedenen NYHA-Schweregraden sowohl bei den CD34+ Stammzellen und den CD34+/CD133+ Stammzellen als auch bei den CD34+/CD133+/VEGFR-2+ Stammzellen zu beobachten ist. Dies stützt die These einer gemeinsamen Abstammung bzw. Funktion dieser Stammzellen. Dabei stellen die CD34+ Stammzellen wahrscheinlich die allgemeinste Stammzellgruppe dar, während die CD34+/CD133+ Stammzellen sehr primitive Stammzellen charakterisieren, welche noch vor einer hämatopoetisch bzw. endothelialen Spezifizierung stehen. Antikörper gegen VEGFR-2 (Flk-1, KDR) wurden einige Zeit als spezifische Marker für die Reihe der endothelialen

## 7. Diskussion

Progenitorzellen angesehen (Yamaguchi et al. 1993). Niedrige CD34+/VEGFR-2+ Stammzellzahlen sind bei KHK-Patienten mit einer erhöhten Häufigkeit von kardiovaskulären Ereignissen, wie zum Beispiel dem Auftreten eines Myokardinfarktes, assoziiert (Werner et al. 2005). Allerdings entwickeln sich die CD34+/CD133+/VEGFR-2+ Stammzellen auch zu Zellen der hämatopoetischen Reihe (Rafii 2000, Schmeisser und Strasser 2002, Urbich und Dimmeler 2004), die VEGFR-2 während ihrer weiteren Differenzierung aber wieder verlieren (Yamaguchi et al. 1993). Die CD34+/CD133+/VEGFR-2+ Stammzellen entwickeln sich daher möglicherweise auf einem Differenzierungsweg von endothelialen Vorläufern, welche noch die Möglichkeit haben, zu Zellen der hämatopoetischen Reihe heranzureifen. Aus den genannten Gründen charakterisiert jedoch auch diese dreifache Markerkombination aus Anti-CD34, Anti-CD133 und Anti-VEGFR-2 die Reihe der endothelialen Progenitorzellen wahrscheinlich ebenfalls nicht eindeutig (Case et al. 2007). Zukünftig muss nach weiteren, noch spezifischeren Markern der endothelialen Vorläuferzellen gesucht werden. Dabei sind auch Kenntnisse über die Signalwege der gefäßbildenden Vorläuferzellen bei ihrer Anheftung an das Endothel bzw. bei der Umwandlung in reife Endothel- oder sogar Herzmuskelzellen wichtig. Die genauen Vorgänge hierbei sind noch nicht vollständig bekannt. Bei der postnatalen Angiogenese sollen sowohl der VEGF/VEGFR-2-Signalweg als auch der Ang-1/Tie-2-Signalweg von Bedeutung sein (Hattori et al. 2001). Es wird vermutet, dass durch die Anregung von Hypoxie und Wachstumsfaktoren auch die Expression von Tie-2-Rezeptoren auf den Membranoberflächen der CD34+ Stammzellen aktiviert wird und durch die Einwirkung von sezernierten Angiopoetinen an diesen Rezeptoren ebenfalls ein Beitrag zur Differenzierung in reife Endothelzellen geleistet wird (Korhonen et al. 1992, Hildbrand et al. 2004). Durch ihre Fähigkeit zur Bildung von VEGF, Ang-1 und Ang-2 tragen die primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen somit auch indirekt zur Vaskulogenese bei (Pomyje et al. 2003). Durch VEGF wird auch der SDF-1/CXCR-4-Signalweg beeinflusst (Salvucci et al. 2002). SDF-1 ist ein Homingfaktor, der besonders auf Lymphozyten und Makrophagen wirkt (Bleul et al. 1996). Er soll auch einen besonderen Einfluss auf den endothelialen Phänotyp von zirkulierenden Stammzellen haben (De Falco et al. 2004). Die zirkulierenden CD34+ Stammzellen exprimieren Rezeptoren für SDF-1, die so genannten CXCR-4, auf ihren Oberflächenmembranen. Der SDF-1/CXCR-4-Signalweg aktiviert die Mobilisation von CD34+ Stammzellen (Aiuti et al. 1997, Wojakowski et al. 2004) und ist für eine stabile Anheftung der zirkulierenden CD34+ Stammzellen an dem verletzten Endothel von großer Bedeutung (Peled et al. 1999, Abbott et al. 2004). Über CXCR-4 erhöht SDF-1 somit die Konzentration der CD34+ Stammzellen an ihrem Zielort (Askari et al. 2003). Fehler

## 7. Diskussion

bei der Expression von CXCR-4 wirken sich somit auch negativ auf die funktionelle Potenz dieser Stammzellen aus, da es dadurch zu Störungen bei der Neovaskulogenese kommt (Peled et al. 1999, Walter et al. 2005). Damit ist neben der Konzentration von SDF-1 auch die korrekte sowie ausreichende Expression von CXCR-4 auf den Oberflächenmembranen der zirkulierenden Vorläuferzellen wichtig. Die Nutzung von Antikörpern gegen CXCR-4 könnte zukünftig bei der quantitativen Erfassung endothelialer Vorläuferzellen von zunehmender Bedeutung sein. Es wurde bereits gezeigt, dass nach akutem Myokardinfarkt vermehrt CD34+/CXCR-4+ Stammzellen unter dem Einfluss von SDF-1 ins periphere Blut mobilisiert werden (Wojakowski et al. 2004). Dies lässt einen deutlichen Zusammenhang dieser Stammzellzahlen mit dem ischämischen Ereignis erkennen. Für die Adhäsion von endothelialen Progenitorzellen am Endothel sollen daneben auch die  $\beta_2$ -Integrine (CD18/CD11) mit ihren Liganden ICAM-1 (CD54) wichtig sein (Urbich und Dimmeler 2004, Wu et al. 2006). Es müssen spezifischere Marker von denjenigen zirkulierenden Stammzellen etabliert werden, die direkt zur Neovaskulogenese und evt. auch zur Erneuerung von Kardiomyozyten beitragen und auf diese Weise eine Verbesserung der Herzfunktion bei bestehender Herzschwäche bewirken können. Dazu sind weitere Studien nötig, die daneben prüfen sollten, ob spezifischer charakterisierte Stammzellen auch genauere Aussagen über die Schweregrade der Herzschwäche zulassen.

Die Charakterisierung von zirkulierenden Stammzellen ist nicht nur durch ihre Quantifizierung, sondern auch durch die Messung ihrer funktionellen Eigenschaften möglich. Unter Zugrundelegung der Annahme, dass nicht nur die Anzahl, sondern auch die Leistungsfähigkeit der Stammzellen entscheidend ist, wäre es für zukünftige Untersuchungen daher sinnvoll, auch ihre funktionelle Potenz zu bestimmen, um prognostische Aussagen zur Herzinsuffizienz treffen zu können. Funktionelle Fähigkeiten gefäßbildender Stammzellen, wie die Aufnahme von acetyliertem LDL oder das Binden von Ulex-lectin, wurden bereits zur Charakterisierung herangezogen. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den „frühen“ und den „späten“ EPC (Hur et al. 2004). Heeschen et al. untersuchten das Ansprechen von CD34+ Stammzellen auf VEGF und SDF-1 und fanden heraus, dass es bei Patienten mit chronisch ischämischen Herzerkrankungen vermindert ist (Heeschen et al. 2004). Da für die verminderte Neovaskularisation beispielsweise auch Defekte der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) verantwortlich gemacht werden (Aicher et al. 2003), wäre auch die routinemäßige Messung der NO-Produktion dieser Zellen denkbar. In folgenden Studien muss dies geprüft und nach weiteren Möglichkeiten für eine zuverlässige Messung der funktionellen Potenz von zirkulierenden Stammzellen gesucht werden, die ihre

## 7. Diskussion

Quantifizierung ergänzen könnte. Dabei sollte nicht nur die Potenz zur Neovaskulogenese, sondern auch die Potenz zur Bildung neuer Kardiomyozyten mit bedacht werden.

Der therapeutische Einsatz von zirkulierenden CD34<sup>+</sup> Stammzellen wurde von einigen Arbeitsgruppen im Rahmen von Studien bereits erfolgreich durchgeführt. Dabei wird von der These ausgegangen, dass es einen Nutzen bringt, wenn die Anzahl von zirkulierenden CD34<sup>+</sup> Stammzellen erhöht wird. Der Einsatz von CD34<sup>+</sup> Stammzellen zeigte dabei eine größere Effektivität als der von unselektierten mononukleären Zellen (Kawamoto et al. 2006). Die Entdeckung, dass die Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> Stammzellen auch bei der Entwicklung von Hämangiomen von Bedeutung ist (Kleinman et al. 2003), bestärkt ihre Funktion bei der Neovaskulogenese. Einen besonderen Stellenwert für die Herzinsuffizienz erhalten die CD34<sup>+</sup> Stammzellen daneben durch ihre Fähigkeit, in Kultur direkt zu Herzmuskelzellen differenzieren zu können (Müller et al. 2002, Badorff et al. 2003). Im Tierversuch mit experimentell erzeugtem Myokardinfarkt bei Ratten und anschließenden Injektionen humaner endothelialer Vorläuferzellen verbesserte sich dosisabhängig sowohl die Neovaskularisation und die Herzfunktion als auch das Überleben der Kardiomyozyten. Das Myokardremodeling war dagegen vermindert (Kawamoto et al. 2001, Kocher et al. 2001, Schuster et al. 2004). Auch die direkte Implantation solcher Zellen in hypoxisches Herzmuskelgewebe von Ratten zeigte Vorteile im klinischen Verlauf, besonders durch die Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion (Kamihata et al. 2001, Kawamoto et al. 2001). Beim Menschen wurden in den letzten Jahren ebenfalls bereits mehrere vielversprechende Studien zum therapeutischen Einsatz von gefäßbildenden CD34<sup>+</sup> Stammzellen durchgeführt (TOPCARE-AMI Studie (Britten et al. 2003), BOOST Studie (Wollert et al. 2004, Schaefer et al. 2006), IACT Studie (Strauer et al. 2005), FIRSTLINE-AMI Studie (Ince et al. 2005), PROTECT-CAD Studie (Tse et al. 2007), REPAIR-AMI Studie (Schächinger 2006) u.a.). Die Möglichkeiten zur Erhöhung der Stammzellzahlen im peripheren Blut sind vielfältig. In den durchgeführten Studien wurden überwiegend die lokale Transplantation von Stammzellen ins Infarktgebiet und die intrakoronare Stammzellinfusion angewendet. Der therapeutische Einsatz von gefäßbildenden Stammzellen sowie die Substitution von Wachstumsfaktoren, die ihre Mobilisation aus dem Knochenmark anregen, unterliegen derzeit noch dem Rahmen von Studien und werden bei der Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz in den Leitlinien aktuell noch nicht empfohlen (Hoppe et al. 2005). Untersuchungen zum therapeutischen Einsatz von infundierten CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> Stammzellen zeigen, dass es zwar zu einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion kommt, es jedoch keinen direkten Zusammenhang zwischen der absoluten Zellzahl und der

## 7. Diskussion

erzielten Wirkung gibt (Britten et al. 2003). Das deutet darauf hin, dass die primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen für eine therapeutische Anwendung wahrscheinlich nicht gut geeignet sind. Möglicherweise entwickeln sie sich nicht spezifisch genug zu solchen Zellen weiter, die direkt die Herzfunktion steigern. Dies könnte an den sehr vielfältigen Differenzierungsmöglichkeiten dieser primitiven Stammzellen liegen. Vermutlich wäre deshalb der Einsatz viel zu großer Zellzahlen notwendig, um wirkliche Erfolge bei der therapeutischen Anwendung der CD34+/CD133+ Stammzellen verzeichnen zu können als es technisch effizient möglich ist. Das Etablieren von spezifischen Markern von gefäß- und kardiomyozytenbildenden Stammzellen könnte es zukünftig erleichtern, die geeigneten Vorläuferzellen gezielt zu isolieren, um sie anschließend zu vermehren und therapeutisch einsetzen zu können. Sowohl die Stammzelltransplantation als auch die intrakoronare Stammzellinfusion sind invasive Therapiemethoden, die mit einem gewissen Risiko sowohl für den Spender als auch für den Empfänger behaftet sind, besonders durch den notwendigen operativen Eingriff sowie die Übertragung von fremden Blutprodukten und der damit verbundenen erhöhten Infektionsgefahr. Der Einsatz dieser beiden Verfahren könnte besonders die in den fortgeschrittenen Herzschwächestadien NYHA III und NYHA IV eingesetzten chirurgischen Therapiemaßnahmen ergänzen.

Eine weniger invasive Möglichkeit die CD34+ Stammzellzahl im peripheren Blut zu erhöhen, ist ihre bereits erwähnte Mobilisation aus dem Knochenmark. Untersuchungen zur Ausbeute zeigten, dass die Funktion von Stammzellen aus dem Knochenmark gleichwertig zu solchen Stammzellen ist, die zuvor mit Wachstumsfaktoren aus dem Knochenmark mobilisiert und anschließend aus dem peripheren Blut isoliert werden (Yamamoto et al. 2004). Die Stammzellmobilisation mit Wachstumsfaktoren ist unspezifisch. Möglicherweise ist hierbei jedoch die Art der mobilisierten Stammzellen auch nur von untergeordneter Bedeutung, da mittlerweile bekannt ist, dass durchaus mehrere phänotypisch verschieden charakterisierte Stammzelltypen zur Neovaskulogenese und möglicherweise auch zur Steigerung der Herzfunktion beitragen. Für die Mobilisation von Stammzellen kommt zum Beispiel VEGF in Frage (Takeshita et al. 1993, Isner et al. 1996, Rafii et al. 2002). Verminderte VEGF-Spiegel im Blut sind mit ischämischen Herzerkrankungen assoziiert und treten auch bei der Herzinsuffizienz auf (Carmeliet et al. 1999, Arakawa et al. 2003). Die Ergebnisse des therapeutischen Einsatzes von VEGF zur Verbesserung der ischämiebedingten myokardialen Dysfunktion waren jedoch nicht zufrieden stellend (Post et al. 2001). Im Tierversuch wurde sogar die Bildung von Hämangiomen und keiner funktionstüchtigen Gefäße beschrieben (Lee et al. 2000). Dies lässt vermuten, dass sich die künstliche Erhöhung der VEGF-Spiegel,

## 7. Diskussion

möglicherweise durch zu hohe Dosen, wiederum negativ auswirkt. Eine andere Möglichkeit zur Erhöhung der Anzahl von CD34+ Stammzellen ist der Einsatz von G-CSF. Mit diesem Wachstumsfaktor können auch die Stammzellen im peripheren Blut von KHK-Patienten (Powell et al. 2005, Honold et al. 2006) sowie nach akutem Myokardinfarkt erhöht werden (Takano et al. 2006, Zohnhöfer et al. 2006). Über den Akt- sowie JAK2-STAT3-Signalweg soll G-CSF zudem die Fähigkeit haben, das myokardiale Remodeling zu verhindern (Harada et al. 2005). Die Anwendung von G-CSF birgt jedoch auch gewisse Risiken, wie zum Beispiel einer möglicherweise vermehrten Re-Infarktrate (Hill et al. 2005) oder einer erhöhten Re-Stenosehäufigkeit, wohingegen Entzündungsreaktionen, Ischämien und die Infarktgröße durch die Applikation von G-CSF wahrscheinlich nicht verschlechtert werden (Kang et al. 2004, Zohnhöfer et al. 2006). Die Stammzellmobilisation durch die Applikation von Wachstumsfaktoren ist auch beim herzinsuffizienten Patienten erfolgreich anwendbar und kann neben der klassischen medikamentösen Therapie zur Symptomverbesserung führen (Takano et al. 2006). Eine Voraussetzung für den Therapieerfolg sind hierbei eigene und vor allem funktionsfähige Stammzellen. Zur Behandlung von Patienten, die funktionell minderwertige Stammzellen haben, könnten diese auch von gesunden und dafür geeigneten Spendern gewonnen werden. Am wenigsten invasiv wäre dabei die Gewinnung adulter Stammzellen aus dem peripheren Blut der Spender. Erschwert wird dies jedoch dadurch, dass auch bei Gesunden nur eine sehr geringe Anzahl solcher Stammzellen im peripheren Blut zirkuliert (Tura et al. 2007). Daher ist zuvor eine Induktion der Stammzellmobilisation aus dem Knochenmark der Spender notwendig. Diese kann ebenfalls durch Verabreichung von G-CSF erreicht werden kann (Stroncek et al. 1997). Daraufhin könnten die Stammzellen isoliert, vermehrt und anschließend dem Patienten als Empfänger lokal mit den speziellen Methoden der Stammzelltherapie zugeführt werden.

Neben der Applikation von Wachstumsfaktoren zeigen auch Versuche zur natürlichen, endogenen Mobilisation von Stammzellen, zum Beispiel durch sportliche Betätigung, Erfolge. Die genauen Zusammenhänge sind noch nicht völlig erforscht. Durch das körperliche Training kommt es wahrscheinlich ischämiebedingt zu einem Ansteigen des VEGF-Plasmaspiegels, womit auch eine Zunahme der Anzahl von zirkulierenden CD34+ Stammzellen im peripheren Blut sowie eine vermehrte Expression von CXCR-4 auf den Membranen der zirkulierenden Vorläuferzellen einhergehen (Adams et al. 2004, Sandri et al. 2005). Daneben nimmt auch die NO-Synthese zu (Steiner et al. 2005). Die sportliche Betätigung ist jedoch als therapeutischer Ansatz wohl eher für den präventiven Einsatz geeignet und dürfte besonders bei den hohen Schweregraden der Herzschwäche schwer zu

## 7. Diskussion

realisieren sein. Der Grund dafür ist, dass besonders die Patienten in den hohen Stadien NYHA III und NYHA IV durch ihre Erkrankung bereits in Ruhe oder schon bei geringen Belastungen körperlich stark eingeschränkt und aus diesem Grund wenig belastbar sind.

Mehrere Autoren schrieben den Statinen (HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren), in geringer Dosierung angewendet, die Fähigkeit zu, die Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden endothelialen CD34+ Progenitorzellen zu erhöhen (Dimmeler et al. 2001, Llevadot et al. 2001, Vasa et al. 2001a, Walter et al. 2002, Weis et al. 2002) und auch ihre funktionelle Potenz zu verbessern (Assmus et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden die Patienten in NYHA III und NYHA IV prozentual wesentlich häufiger mit Statinen behandelt (55,8 % und 79,2 %) als die Patienten in NYHA I und NYHA II (36,4 % und 43,5 %). Trotzdem war die Anzahl der CD34+/CD133+ Stammzellen in den hohen Schweregraden signifikant niedriger als in den geringen Herzschwächestadien, womit ein positiver Effekt der Statintherapie auf die Anzahl der primitiven Stammzellen mit den Ergebnissen nicht eindeutig bestätigt werden kann. Es ist allerdings denkbar, dass die CD34+/CD133+ Stammzellzahlen in den hohen NYHA-Stadien ohne die beschriebenen positiven Effekte bei der Einnahme von Statinen noch viel geringer wären. Erhebungen zur individuellen Dosierung der Statintherapie wurden in der Arbeit nicht durchgeführt, so dass hierzu keine Aussagen möglich sind. Eine andere Erklärung könnte aber auch die bereits diskutierte, erhöhte Rate an Komorbiditäten in den hohen NYHA-Stadien sein. Ihre Wirkung, die CD34+ Stammzellzahl im Blut zu senken, überlagert möglicherweise die positiven Effekte der Statine auf die Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen. Eine andere Ursache könnte sein, dass die Anzahl der CD34+/CD133+ Stammzellen im Gegensatz zu der der „späten“ EPC nicht von Statinen beeinflusst wird.

Die Entdeckung, dass verminderte CD34+/CD133+ Stammzellzahlen im Blut mit dem Auftreten von ischämischen Erkrankungen verbunden sind, eröffnet vermutlich auch neue Wege in der Früherkennung der Herzinsuffizienz bzw. in der Erfassung von Risikopatienten, die möglicherweise durch niedrige Stammzellzahlen im Blut dazu prädisponiert sind, im weiteren Verlauf eine Herzschwäche zu entwickeln. So könnten durch Messung der CD34+/CD133+ Stammzellzahlen schon im Vorfeld diejenigen Patienten erkannt werden, die besonders niedrige Stammzellzahlen im Blut haben und daher möglicherweise von einer gezielten Stammzelltherapie mit Erhöhung der Zellzahlen profitieren würden, um der Entwicklung einer Herzinsuffizienz bereits präventiv entgegenzuwirken bzw. ein Voranschreiten zu verzögern. Dabei stellt sich die Frage, welche Patienten von der Stammzellquantifizierung mit Durchführung einer Stammzelltherapie wohl am meisten

## 7. Diskussion

profitieren würden. Betrachtet man die Ursachen der chronischen Herzinsuffizienz, so entwickelt sich ein hoher Prozentsatz aus einer ischämischen Herzerkrankung und durchaus gehäuft nach einem vorausgegangenen Myokardinfarkt. Die Ergebnisse zur Anzahl der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen bei den KHK-Patienten im Vergleich zu Gesunden sind in der Literatur unterschiedlich. So berichteten einige Arbeitsgruppen über verminderte CD34+ und CD34+/CD133+ Stammzellzahlen bei KHK-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Eizawa et al. 2004a, Powell et al. 2005), während andere keine Unterschiede zu der gesunden Kontrollgruppe feststellten (Vasa et al. 2001b). Bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nahmen die primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen im peripheren Blut der Herzinsuffizienten durchschnittlich einen Anteil von 0,007 % an den Leukozyten und 0,04 % an den Lymphozyten ein. Verglichen mit KHK-Patienten, bei denen ca. 0,10 % der Lymphozyten positiv für CD34 sowie CD133 sind (Lambiase et al. 2004), scheinen bei herzinsuffizienten Patienten nur etwa die Hälfte dieser primitiven CD34+/CD133+ Stammzellen im Blut zu zirkulieren. Möglicherweise ist dies auf die Ätiopathogenese der Herzinsuffizienz zurückzuführen: Liegt der Herzinsuffizienz eine KHK zugrunde, dann wird der Herzmuskel u.a. durch die chronische Ischämie oder akut durch einen Myokardinfarkt geschädigt. Es ist denkbar, dass die Entstehung der Herzinsuffizienz aus einer KHK heraus durch eine verminderte Anzahl primitiver zirkulierender CD34+/CD133+ Stammzellen begünstigt wird. So entwickeln möglicherweise eher solche KHK-Patienten mit erniedrigten Stammzellzahlen im Blut nach einem durchgemachten Myokardinfarkt eine Herzinsuffizienz als diejenigen mit normalen Stammzellzahlen. Diese Risikopatienten könnten durch die Messung ihrer verminderten Stammzellzahlen im peripheren Blut erfasst werden. Dadurch wäre es bereits frühzeitig möglich, sie einer therapeutischen Stammzellvermehrung zu unterziehen, was möglicherweise bereits die Infarktrate senken und die Entwicklung einer chronischen Herzschwäche verhindern oder wenigstens hinauszögern könnte. Weitere Studien müssen prüfen, ob es durch die Quantifizierung der Stammzellzahlen schon bei den Risikopatienten realisierbar ist, prognostische Aussagen über die mögliche Entwicklung einer Herzschwäche treffen zu können.

Eine Einschränkung für die Aussagekraft von den Messungen der CD34+ Stammzellzahlen im Blut stellt allerdings der Zustand nach einem akuten Myokardinfarkt dar. Kurz nach diesem Ereignis werden die Stammzellen, vermutlich auf Grund des hohen endogenen Ischämieereizes, ins Blut mobilisiert, wodurch ihre Anzahl ansteigt und das Messergebnis allein dadurch verfälschen würde. Ein weiteres Problem sind daneben rezidivierende,



## 7. Diskussion

unbemerkte Re-Infarkte (Parera et al. 2004). Die sofortige Behandlung nach einem akuten Myokardinfarkt scheint jedoch sehr viel versprechend für den Krankheitsverlauf zu sein (Franz 2004), so dass eine Messung der Stammzellzahlen hier womöglich sogar überflüssig ist. Erfolge zeigen zum Beispiel intrakoronare Stammzellinfusionen nach akutem Myokardinfarkt, welche die Remodelingvorgänge des Herzens positiv beeinflussen (Janssens et al. 2006) und zudem auch die kontraktile Funktion des linken Ventrikels verbessern (Schächinger et al. 2006). Durch die rechtzeitige Substitution von G-CSF nach perkutaner koronarer Intervention (PCI) wird die Durchblutung im Infarktgebiet erhöht (Engelmann et al. 2006). Eine möglichst frühzeitige Steigerung der SDF-1-Konzentration im frischen Infarktgebiet spielt für das Outcome nach einem akuten Myokardinfarkt wahrscheinlich ebenfalls eine bedeutende Rolle (Askari et al. 2003). Bei der kombinierten Anwendung von G-CSF mit SDF-1 scheinen sich die positiven Wirkungen beider Faktoren auf die Neovaskulogenese sogar gegenseitig zu verstärken (Tan et al. 2007). Selbst mehrere Wochen nach einem durchgemachten Myokardinfarkt bewirken intrakoronare Stammzellinfusionen noch eine Verbesserung der Ejektionsfraktion des Herzens (Assmus 2006). Ein Follow-up der BOOST Studie ergab, dass die einmalig angewendete Stammzellinfusion zwar die Herzfunktion verbessert, dieser Vorteil im Langzeitverlauf aber wieder verschwindet (Meyer et al. 2006). Daher ist es wahrscheinlich notwendig, die Stammzelltherapien in gewissen Abständen zu wiederholen, so wie es auch bei der Gabe von Medikamenten oder anderen Blutprodukten üblich ist. Welche Methoden letztlich am besten für die routinemäßige Anwendung geeignet sind und gleichzeitig am wenigsten Komplikationen verursachen, muss durch weitere Studien eruiert werden. Die frühzeitige Erhöhung der Stammzellzahlen könnte durch die zu erzielende Verbesserung der Herzleistung möglicherweise dazu fähig sein, die Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz zu verhindern bzw. ihr Voranschreiten zu verzögern. Ob die Quantifizierung der primitiven zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen für die Erfassung von Risikopatienten geeignet wäre, ist denkbar, muss aber durch weitere Studien geprüft werden.

### 8. Schlussfolgerungen

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der CD34+/CD133+ Stammzellen im peripheren Blut abhängig vom Schweregrad der Herzinsuffizienz abnimmt. Erklärbar ist diese Verringerung durch eine Erhöhung ihres Verbrauchs, eine Störung ihrer Mobilisation aus dem Knochenmark, eine Verkürzung ihrer Überlebenszeiten, eine Bevorzugung anderer Differenzierungswege sowie durch andere Ursachen, wie die ansteigende Rate an Komorbiditäten in den hohen NYHA-Stadien. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Quantifizierung der CD34+/CD133+ Stammzellen eine gute Unterscheidung zwischen den leichten und schweren Herzschwächestadien erlauben, wobei die Abstufung zwischen NYHA I/II, NYHA III und NYHA IV möglich ist. Sie scheint zur Verlaufskontrolle geeignet zu sein. Eine genaue Differenzierung zwischen NYHA I und II lässt sie dagegen nicht zu. Für die Klassifizierung der Herzschwächestadien haben die CD34+/CD133+ Stammzellzahlen eine höhere Aussagekraft als die CD34+, CD34+/CD133-, CD133+ oder CD133+/CD34- Zellen. Ein Nachteil der CD34+/CD133+ Stammzellen ist, dass sie nicht spezifisch für Neovaskulogenese und Herzfunktion zuständig sind, sondern auch primitive Vorläufer der Hämatopoese darstellen. Trotzdem scheint die Messung der CD34+/CD133+ Zellzahlen zur Beurteilung der Herzschwächestadien geeignet zu sein. In weiteren Studien müssen noch spezifischere Marker solcher Stammzellen analysiert werden, welche die Neovaskulogenese und die Erneuerung von Kardiomyozyten beeinflussen und direkt zur Verbesserung der Herzfunktion beitragen. Als Ergänzung für die Quantifizierung der Stammzellen ist auch die Beurteilung ihrer funktionellen Potenz sinnvoll. Zukünftig sollten einheitliche und besonders Zeit und Kosten sparende Methoden etabliert werden, um einen routinemäßigen Einsatz der Stammzellmessung zu ermöglichen. Ein bestehender Mangel an zirkulierenden Stammzellen könnte bereits bei Risikopatienten der Herzschwäche, z.B. bei KHK-Patienten, erkannt werden. Durch frühzeitig angewendete Stammzelltherapien könnte so bereits die Entwicklung der Herzschwäche verhindert oder ihr Voranschreiten verzögert werden. Zusammenfassend ist aus den Ergebnissen abzuleiten, dass es durch die Quantifizierung der im Blut zirkulierenden CD34+/CD133+ Stammzellen möglich ist, eine Differenzierung zwischen den Schweregraden der Herzinsuffizienz vorzunehmen und sie möglicherweise auch für die Verlaufskontrolle zu nutzen. Weitere Studien müssen prüfen, ob die Messung der CD34+/CD133+ Stammzellen auch Aussagen zur Prognose von Risikopatienten der Herzschwäche ermöglichen.

## 9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. 2004. Stromal cell-derived factor-1 alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*, 110:3300-3305.
- Adams V, Lenk K, Linke A, Dominik L, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmrich F, Schuler G, Hanbrecht R. 2004. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24:684-690.
- Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. 2003. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nature Medicine*, 9 (11):1370-1376.
- Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Guiterrez-Ramos JC. 1997. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med*, 185 (1):111-120.
- Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. 1986. Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood*, 67 (3):842-845.
- Arakawa H, Ikeda U, Hojo Y, Ueno S, Nonaka-Sarukawa M, Yamamoto K, Shimada K. 2003. Decreased serum vascular endothelial growth factor concentration in patients with congestive heart failure. *Heart*, 89 (2):207-208.
- Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. 1998. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest*, 101 (1):40-50.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler T, Schatteman G, Isner JM. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275:964-967.
- Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. 1999. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 18 (14):3964-3972.
- Asahara T, Kawamoto A. 2004. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287:C572-C579.
- Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS. 2003. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*, 362:697-703.
- Assmus B, Urbich C, Aicher A, Hofmann WK, Haendeler J, Rössig L, Spyridopoulos I, Zeiher AM, Dimmeler S. 2003. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circulation Research*, 92:1049-1055.
- Assmus B, Honold J, Schächinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. 2006. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 355:1222-1232.
- Athanassopoulos P, Vaessen LMB, Maat APWM, Balk AHMM, Weimar W, Bogers AJJC. 2004. Peripheral blood dendritic cells in human end-stage heart failure and the early post-transplant period: evidence for systemic Th1 immune responses. *Eur J Cardiothorac Surg*, 25:619-626.

## 9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S. 2003. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functional active cardiomyocytes. *Circulation*, 107:1024-1032.
- Bahlmann FH, de Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D. 2004. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*, 103 (921-926)
- Barrande C, Traore Y, Szekeres G, Hirn J. 1993. Isolation and characterization of two new monoclonal antibodies against the CD34 molecule. *Hybridoma*, 12 (2):203-213.
- Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA. 1994. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-Selectin. *Blood*, 84 (8):2554-2565.
- Baumhueter S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD, and Lasky LA. 1993. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science*, 262:436-438.
- Bhattacharya V, McSweeney PA, Shi Q, Bruno B, Ishida A, Nash R, Storb RF, Sauvage LR, Hammond WP, Hong-De Wu M. 2000. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34+ bone marrow cells. *Blood*, 95:581-585.
- Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. 1996. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*, 184:1101-1109.
- Bompais H, Chagraoui J, Canron X, Crisan M, Liu XH, Anjo A, Tolla-Le Port C, Leboeuf M, Charbord P, Bikfalvi A, Uzan G. 2004. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*, 103:2577-2584.
- Bouvier CA, Gaynor E, Cintron JR, Bernhardt B, Spaet TH. 1970. Circulating endothelium as an indication of vascular injury. *Thromb Diath Haemorrh Suppl*, 40:163-168.
- Brando B, Barnett D, Janossy G, Mandy F, Autran B, Rothe G, Scarpati B, D'Avanzo G, D'Hautcourt JL, Lenkei R, Schmitz G, Kunkl A, Chianese R, Papa S, Gratama JW. 2000. Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. *Cytometry*, 42:327-346.
- Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schächinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. 2003. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*, 108:2212-2218.
- Brown J, Greaves MF, Molgaard HV. 1991. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immun*, 3 (2):175-184.
- Brunner-La Rocca HP. 2003. Praktisches Vorgehen bei der Diagnostik der Herzinsuffizienz. *Schweiz Med Forum*, 48:1164-1170.
- Cabezudo E, Querol S, Cancelas JA, García J. 1999. Comparison of volumetric capillary cytometry with standard flow cytometry for routine enumeration of CD34+ cells. *Transfusion*, 39:864-872.
- Carmeliet P. 2004. Manipulating angiogenesis in medicine. *J Internal Med*, 255:538-561.
- Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, Shima DT. 1999. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nature Medicine*, 5 (5):495-502.
- Carmeliet P, Jain RK. 2000. Angiogenesis in cancer and other disease. *Nature*, 407:249-257.

## 9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, Saadatzadeh MR, Bhavsar JR, Yoder MC, Haneline LS, Ingram KA. 2007. Human CD34(+)AC133(+)VEGFR-2(+) cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol*, 35 (7):1109-1118.
- Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. 1992. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic langerhans cells. *Nature*, 360 (6401):258-261.
- Cell and Molecular Imaging Center 08.08.2006. Abbildung FACSCalibur Durchflusszytometer [Internet]. <http://cmic.sfsu.edu/images/CaliburY2KWhtBkg.jpg>.
- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. 2004. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature Medicine*, 10 (8):858-864.
- Choi JH, Kim KL, Huh W, Kim B, Byun J, Suh W, Sung J, Jeon ES, Oh HY, Kim DK. 2004. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24:1246-1252.
- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. 1998. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, 125:725-732.
- Chong AY, Blann AD, Patel J, Freestone B, Hughes E, Lip GYH. 2004. Endothelial dysfunction and damage in congestive heart failure: relation of flow-mediated dilatation to circulating endothelial cells, plasma indexes of endothelial damage, and brain natriuretic peptide. *Circulation*, 110:1794-1798.
- Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. 1984. Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immun*, 133 (1):157-165.
- Corbeil D, Röper K, Fargeas CA, Joester A, Huttner WB. 2001. Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic*, 2:82-91.
- Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF. 2000. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circulation Research*, 87:728-730.
- Dao Q, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Harrion A, Amirnovin R, Lenert L, Clopton P, Alberto J, Hlavin P, Maisel AS. 2001. Utility of B-type natriuretic peptide (BNP) in the diagnosis of CHF in an urgent care setting. *J Am Coll Cardiol*, 37:379-385.
- Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Hervé P, Etievent JP, Kantelip JP. 2003. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation*, 108:II-253.
- De Falco D, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A, Truffa S, Biglioli P, Napolitano M, Capogrossi MC, Pesce M. 2004. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood*, 104:3472-3482.
- De Lemos JA, Morrow DA, Bentley JH, Omland T, Sabatine MS, McCabe CH, Hall C, Cannon CP, Braunwald E. 2001. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 345 (14):1014-1021.
- de Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, Rafferty JA, Burt D, Guenechea G, Bueren JA, Gagen D, Fairbairn LJ, Lord BI, Testa NG. 1998. CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOS/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells*, 16 (6):387-396.
- Delfini C. 2002. Expression of CD133 on a human cell line lacking CD34. *Leukemia*, 16:2174-2175.

## 9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Delia D, Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E, Aiello A, Fontanella E, Soligo D, Pierotti MA, Greaves MF. 1993. CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood*, 81 (4):1001-1008.
- Diamond diagnostics 31.01.2007. Abbildung Cell-Dyn 4000 Blutanalysegerät [Internet]. [http://www.diamonddiagnostics.com/images/spec/Abbott\\_Cell\\_Dyn\\_4000.jpg](http://www.diamonddiagnostics.com/images/spec/Abbott_Cell_Dyn_4000.jpg).
- Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rütten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. 2001. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/ Akt pathway. *J Clin Invest*, 108:391-397.
- Eizawa T, Ikeda U, Murakami Y, Matsui K, Yoshioka T, Takahashi M, Muroi K, Shimada K. 2004a. Decrease in circulating endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *Heart*, 90 (6):685-686.
- Eizawa T, Ikeda U, Murakami Y, Matsui K, Yoshioka T, Suzuki C, Takahashi M, Muroi K, Kamisawa O, Fuse K, Shimada K. 2004b. Increase in circulating endothelial progenitor cells after aortic aneurysm repair. *Heart and Vessels*, 19 (3):107-110.
- Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C, Huber A, Wintersperger BJ, Werle-Reudinger AE, Schoenberg SO, Steinbeck G, Franz WM. 2006. Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization. *J Am Coll Cardiol*, 48:1712-1721.
- European Study Group on Diastolic Heart Failure. 1998. How to diagnose diastolic heart failure. *Eur Heart J*, 19:990-1003.
- Fiedler U, Christian S, Koidl S, Kerjaschki D, Emmett MS, Bates DO, Christofori G, Augustin HG. 2006. The sialomucin CD34 is a marker of lymphatic endothelial cells in human tumors. *Am J Pathol*, 168 (3):1045-1053.
- Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. 1990. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*, 75 (12):2417-2426.
- Flamme I, Risau W. 1992. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*, 116 (2):435-439.
- Florek M, Haase M, Marzesco AM, Freund D, Ehninger G, Huttner WB, Corbeil D. 2005. Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res*, 319:15-26.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 16 (9):4604-4613.
- Franz WM. 2004. Stammzellmobilisation nach akutem Myokardinfarkt? Pressemitteilung der Deutschen Gesellschaft für Herz- und Kreislaufforschung eV, Presstext:04/2004.
- Friedrich EB, Walenta K, Scharlauch J, Nickenig G, Werner N. 2006. A CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circulation Research*, 98:20-25.
- Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, Jin D, Takai S, Miyazaki M, Egashira K, Imada T, Iwasaka T, Matsubara H. 2003. Bone Marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circulation Research*, 93:980-989.
- Fürstenberger G, von Moos R, Lucas R, Thürlimann B, Senn HJ, Hamacher J, Boneberg EM. 2006. Circulating endothelial cells and angiogenic serum factors during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer. *Brit J Cancer*, 94:524-531.

## 9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, Carbone DP. 1998. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vitro. *Blood*, 92 (11):4150-4166.
- Gajkowska A, Oldak T, Jastrzevska M, Machaj EK, Walewski J, Kraszewska E, Pojda Z. 2006. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of three methods. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 44 (1):53-60.
- Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M. 2000. Isolation and characterization of human CD34- lin- and CD34+ lin- hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood*, 95:2813-2820.
- Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W. 2000. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*, 95 (10):3106-3112.
- George J, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A. 2006. Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells. *Tissue Engineering*, 12 (2):331-335.
- Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. 2001. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2+ AC133+ endothelial precursor cells. *Circulation Research*, 88:167-174.
- Grant MB, May WS, Cabellero S, Brown GAJ, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW. 2002. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nature Medicine*, 8 (6):607-612.
- Grundmann F, Scheid C, Braun D, Zobel C, Reuter H, Schwinger RHG, Müller-Ehmsen J. 2007. Differential increase of CD34, KDR/CD34, CD133/CD34 and CD117/CD34 positive cells in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction. *Clin Res Cardiol*, 96 (9):621-627.
- Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S, Fuster J, Fuster V. 1999. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation*, 100:1481-1492.
- Guthrie SM, Curtis LM, Mames RN, Simon GG, Grant MB, Scott EW. 2005. The nitric oxide pathway modulates hemangioblast activity of adult hematopoietic stem cells. *Blood*, 105:1916-1922.
- Hajnoczky G, Buzas CJ, Pacher P, Hoek JB, Rubin E. 2005. Alcohol and mitochondria in cardiac apoptosis: mechanisms and visualisation. *Clin Exp Res*, 29 (5):693-701.
- Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, Ohtsuka M, Matsuura K, Sano M, Nishi J, Iwanaga K, Akazawa H, Kunieda T, Zhu W, Hasegawa H, Kunisada K, Nagai T, Nakaya H, Yamauchi-Takahara K, Komuro I. 2005. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nature Medicine*, 11:305-311.
- Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tatenos M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MAS, Rafii S. 2001. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, 193 (9):1005-1014.
- Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. 1995. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:12240-12244.

## 9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. 2004. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation*, 109:1615-1622.
- Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. 2003. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*, 102:1340-1346.
- Heidenreich S. 1999. Monocyte CD14: a multifunctional receptor engaged in apoptosis from both sides. *J Leukoc Biol*, 65:737-743.
- Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, Schaper W. 2002. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283:H2411-H2419.
- Hess OM. 2003. Herzinsuffizienz: Definition, Ursachen und Formen. *Schweiz Med Forum*, 48:1158-1163.
- Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, Inoue S, Zhao Q, Kitamoto S, Sata M, Ichiki T, Takeshita A, Egashira K. 2004. Gene transfer of stromal cell-derived factor 1 alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway. *Circulation*, 109:2454-2461.
- Hildbrand P, Cirulli V, Prinsen RC, Smith KA, Torbett BE, Salomon DR, Crisa L. 2004. The role of angiopoietins in the development of endothelial cells from cord blood CD34+ progenitors. *Blood*, 104:2010-2019.
- Hill JM, Syed MA, Arai AE, Powell TM, Paul JD, Zalos G, Read EJ, Khuu HM, Leitman SF, Horne M, Csako G, Dunbar CE, Waclawiw MA, Cannon RO. 2005. Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 46 (9):1643-1648.
- Hladovec J, Prerovsky I, Stanek V, Fabian J. 1978. Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris. *Klinische Wochenschrift*, 56:1033-1036.
- Ho KKL, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D. 1993. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation*, 88:107-115.
- Hobbs FDR, Kenkre JE, Roalfe AK, Davis RC, Hare R, Davies MK. 2002. Impact of heart failure and left ventricular systolic dysfunction on quality of life. *Eur Heart J*, 23:1867-1876.
- Homles SJ, Espiner EA, Richards AM, Yandle TG, Frampton C. 1993. Renal, endocrine, and hemodynamic effects of human brain natriuretic peptide in normal man. *J Clin Endocrinol Metab*, 76:91-96.
- Honold J, Lehmann R, Heeschen C, Walter DH, Assmus B, Sasaki KI, Martin H, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. 2006. Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26:1-6.
- Hoppe UC. 2007. Herzerkrankungen bei Tumoren und Tumorthherapie. *Der Internist*, 48 (3):268-275.
- Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E. 2005. Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung e.V.). *Z Kardiol*, 94:488-509.
- Horn M, Vollandt R, Hrsg. 1995. Biometrie: Multiple Tests und Auswahlverfahren. 1te Aufl. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.
- Huang X, Cho S, Spangrude GJ. 2007. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death and Differentiation*, 14:1851-1859.



## 9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. 2004. Charakterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24:288-293.
- Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Schmidt H, Rehders T, Körber T, Schürmichen C, Freund M, Nienaber CA. 2005. Preservation from left ventricular remodeling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI). *Circulation*, 112:3097-3106.
- Isner JM, Asahara T. 1999. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, 103 (9):1231-1236.
- Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes J. 1996. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet*, 348 (9024):370-374.
- Iversen PO, Woldbaek PR, Tonnessen T, Christensen G. 2002. Decreased hematopoiesis in bone marrow of mice with congestive heart failure. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 282:R166-R172.
- Jaatinen T, Hemmoranta H, Hautaniemi S, Niemi J, Nicorici D, Laine J, Yli-Harja O, Partanen J. 2006. Global gene expression profile of human cord blood-derived CD133+ cells. *Stem Cells*, 24:631-641.
- Jacobs W. 2006. Fatal amphetamine-associated cardiotoxicity and its medicolegal implications. *Am J Forens Med Pathol*, 27 (2):156-160.
- Janssens S, Dubais C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, van de Werf F. 2006. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Lancet*, 367:113-121.
- Kaesemeyer WH. 1994. Holding smokers accountable for heart disease costs. *Circulation*, 90:1029-1032.
- Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T, Symes JF. 2000. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg*, 70:829-834.
- Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T. 2001. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*, 104:1046-1052.
- Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee K, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM, Park YB. 2004. Effects of intracoronary infusion of periperal blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*, 363:751-756.
- Kannel WB, Castelli WP, McNamara PM, McKee PA, Feinleib M. 1972. Role of blood pressure in the development of congestive heart failure. The Framingham Study. *N Engl J Med*, 287:781-787.
- Karow T, Große-Heitmeyer W, Bienstein B, Stauff L. 1998. Herzinsuffizienz bei immunogener Hyperthyreose - Akute Globaldekomensation bei fehlender kardialer Vorschädigung. *Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 35 (8):705-710.
- Katz SD, Khan T, Zeballos GA, Mathew L, Porharlanka P, Knecht M, Whelan J. 1999. Decreased activity of the L-Arginine-Nitric Oxide metabolic pathway in patients with congestive heart failure. *Circulation*, 99:2113-2117.

## 9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. 2001. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*, 103:634-637.
- Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano KM, Murayama T, Oyamada A, Silver M, Hulbert C, Gavin M, Hanley A, Ma H, Kearney M, Zak V, Asahara T, Losordo D. 2006. CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation*, 114:2163-2169.
- Keefe DL. 2002. Trastuzumab-associated cardiotoxicity. *Cancer*, 95 (7):1592-1600.
- Kenchiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PWF, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, Vasan RS. 2002. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med*, 347 (5):305-313.
- Khan SS, Solomon MA, McCoy JP. 2005. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry*, 64B:1-8.
- Kilter H, Böhm M. 2004. Von der Hypertonie zur Herzinsuffizienz - eine pathophysiologische Entwicklung. *Herz*, 29:239-247.
- Kitzman DW, Little WC, Brubaker PH, Anderson RT, Hundley WG, Marburger CT, Brosnihan B, Morgan TM, Stewart KP. 2002. Pathophysiological characterization of isolated diastolic heart failure in comparison to systolic heart failure. *JAMA*, 288 (17):2144-2150.
- Kleinman ME, Tepper OM, Capla JM, Bhatt KA, Ceradini DJ, Galiano RD, Blei F, Levine JP, Gurtner GC. 2003. Increased circulating AC133+ CD34+ endothelial progenitor cells in children with hemangioma. *Lymphatic Research and Biology*, 1 (4):301-307.
- Kobari L, Giarratana MC, Pflumio F, Izac B, Coulombel L, Douay L. 2001. CD133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *J Hematother Stem Cell Res*, 10:273-281.
- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edward NM, Itescu S. 2001. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature Medicine*, 7 (4):430-436.
- Kompetenznetz Herzinsuffizienz, Datensammlung Epidemiologie. 2004. Fact Sheet Herzinsuffizienz Münster: Universität Münster.
- Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T. 2004. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24:1442-1447.
- Korhonen J, Partanen J, Armstrong E, Vaahtokari A, Elenius K, Jalkanen M, Alitalo K. 1992. Enhanced expression of the tie receptor tyrosine kinase in endothelial cells during neovascularization. *Blood*, 80 (10):2548-2555.
- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. 1996. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 87 (1):1-13.
- Krause DS, Ito T, Fackler MJ, Smith OM, Collector MI, Sharkis SJ, May WS. 1994. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*, 84 (3):691-701.
- Kuci S, Wessels JT, Bühring HJ, Schilbach K, Schumm M, Seitz G, Löffler J, Bader P, Schlegel PG, Niethammer D, Handgretinger R. 2002. Identification of a novel class of human adherent CD34- stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood*, 101 (3):869-876.
- Kusuyama T, Omura T, Nishiya D, Enomoto S, Matsumoto R, Takeuchi K, Yoshikawa J, Yoshiyama M. 2006. Effects of treatment for diabetes mellitus on circulating vascular progenitor cells. *J Pharmacol Sci*, 102:96-102.

## 9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Laing AJ, Dillon JP, Condon ET, Street JT, Wang JH, McGuinness AJ, Redmond HP. 2007. Mobilization of endothelial precursor cells: systemic vascular response to musculoskeletal trauma. *J Orthop Res*, 25:44-50.
- Lambiase P, Edwards RJ, Anthopoulos P, Rahman S, Meng G, Bucknall CA, Redwood SR, Pearson JD, Marber MS. 2004. Circulating humoral factors and endothelial progenitor cells in patients with differing coronary collateral support. *Circulation*, 109:2986-2992.
- Latif N, Kahn MA, Birks E, O'Farrell A, Westbrook J, Dunn MJ, Yacoub MH. 2000. Upregulation of the Bcl-2 family of proteins in end stage heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 35:1769-1777.
- Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Mische E, Böhm M, Nickenig G. 2004. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*, 109:220-226.
- Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose WE, Shaw R, Ursell PC, Blau HM. 2000. VEGF gene delivery to myocardium. *Circulation*, 102:898.
- Levering WHBM, Preijers FWMB, van Wieringen WN, Kraan J, van Beers WAM, Sintnicolaas K, van Rhenen DJ, Gratama JW. 2007. Flow cytometric CD34+ stem cell enumeration: lessons from nine years' external quality assessment within the Benelux countries. *Cytometry*, 72B:178-188.
- Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. 1990. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*, 323:236-241.
- Li Z, Bing OH, Ling X, Robinson KG, Lakatta EG. 1997. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol*, 272:H2313-H2319.
- Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. 2000. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*, 105 (1):71-77.
- Ljoyd-Jones DM, Nam BH, D'Agostino RB, Levy D, Murabito JM, Wang TJ, Wilson PWF, O'Donnell CJ. 2004. Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults. *JAMA*, 291 (18):2204-2211.
- Llavadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T. 2001. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*, 108:399-405.
- Loomans CJM, de Koning EJP, Staal FJT, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. 2004. Endothelial progenitor cell dysfunction - A novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type I diabetes. *Diabetes*, 53:195-199.
- Ma FX, Zhou B, Zhong C, Ren Q, Lu SH, Sawamura T, Han ZC. 2006. Oxidized low density lipoprotein impair endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Lipid Res*, 47 (6):1227-1237.
- Maciejewski J, Selleri C, Anderson S, Young NS. 1995. Fas antigen expression on CD34+ human bone marrow cells is induced by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. *Blood*, 85:3183-3190.
- Majka M, Janowska-Wieczorek A, Rataczak J, Ehrenman K, Pietrzkowski Z, Kowalska MA, Gewirtz AM, Emerson SG, Ratajczak MZ. 2001. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34+ cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*, 97:3075-3085.
- Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ. 2003. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nature Medicine*, 9 (11):1195-1201.

## 9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, De Ferrari GM, Ferlini M, Goffredo L, Bertoletti A, Klersy C, Pecci A, Moratti R, Tavazzi L. 2005. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood*, 105:199-206.
- Matsumoto T, Claesson-Welsh L. 2001. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*, 2001 (112):re21.
- Mausser M, Billmann P, Fleischmann D. 2001. Akuter Myokardinfarkt bei der Phäochromozytom-Krise. *Z Kardiol*, 90 (4):297-303.
- McMurray J, Stewart S. 2000. Heart failure: epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart*, 83:596-602.
- Mehra MR, Uber PA, Park M, Scott RL, Ventura HO, Harris BC, Frohlich ED. 2004. Obesity and suppressed B-type natriuretic peptide levels in heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 43 (9):1590-1595.
- Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. 2006. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOW transfer of enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation*, 113 (10):1287-1294.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmakol Rev*, 56 (2):185-229.
- Moorjani N, Catarino P, Trabzuni D, Saleh S, Moorji A, Dzimir N, Al-Mohanna F, Westaby S, Ahmad M. 2007. Upregulation of Bcl-2 proteins during the transition of pressure overload-induced heart failure. *Int J Cardiol*, 116 (1):27-33.
- Mosterd A, Cost B, Hoes AW, de Bruijne MC, Deckers JW, Hofman A, Grobbee DE. 2001. The prognosis of heart failure in the general population The Rotterdam Study. *Eur Heart J*, 22:1318-1327.
- Müller C, Brunner La-Rocca HP, Buster P. 2004. Diagnostischer Einsatz der natriuretischen Peptide. *Kardiovaskuläre Medizin*, 7:459-464.
- Müller P, Pfeiffer P, Koglin J, Schäfers HJ, Seeland U, Janzen I, Urbschat S, Böhm M. 2002. Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. *Circulation*, 106:31-35.
- Murabito JM, Pencina MJ, Nam BH, D'Agostino RB, Wang TJ, Lloyd-Jones D, Wilson PWF, O'Donnell CJ. 2005. Sibling cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults. *JAMA*, 294 (24):3117-3123.
- Murray PDF. 1932. The development in vitro of the blood of the early chick embryo. *Proc Roy Soc London*, 11:497-521.
- Mutin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F. 1999. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood*, 93 (9):2951-2958.
- Nakamura Y, Ando K, Chargui J, Kawada H, Sato T, Tsuji T, Hotta T, Kato S. 1999. Ex vivo generation of CD34+ cells from CD34- hematopoietic cells. *Blood*, 94:4053-4059.
- Newman PJ. 1994. The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Ann NY Acad Sci*, 714:165-174.
- Oeppen J, Vaupel JW. 2002. Broken limits to life expectancy. *Science*, 296:1029-1031.
- Parera D, Kanaganayagam G, Marber MS. 2004. Stem cells in unstable angina: the dynamic duo. *Eur Heart J*, 25:999-1000.
- Parrella G, Brusini P, Spelat R, Hossain P, Hopkinson A, Dua HS. 2007. Expression of haematopoietic stem cell markers, CD133 and CD34 on human corneal keratocytes. *Br J Ophthalmol*, 91 (1):94-99.

## 9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Parsi RA, Parsi E. 2001. Herzinsuffizienz. In: Parsi, Hrsg. Kardiologie, Angiologie. 1te Aufl. München, Jena: Urban & Fischer, 658.
- Peault BM, Thiery JP, Douarin NML. 1983. Surface marker for hematopoietic and endothelial cell lineages in quail that is defined by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:2976-2980.
- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MAS, Rafii S. 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 95 (3):952-958.
- Peled A, Grabovsky V, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Petit I, Ben-Hur H, Lapidot T, Alon R. 1999. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34+ cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest*, 104:1199-1211.
- Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, Botta R, Gabbianelli M, Lulli V, Marzali G, Masella B, Müller R, Sgadari C, Testa U, Bonanno G, Peschle C. 2002. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood*, 100 (9):3203-3208.
- Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. 1992. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 189 (2):824-831.
- Pichler M. 1999. Epidemiologie, Pathophysiologie und Klinik der Herzinsuffizienz. *J Kardiol*, 12:602-606.
- Pomyje J, Ziviny J, Sefc L, Plasilova M, Pytlik R, Necas E. 2003. Expression of genes regulating angiogenesis in human circulating hematopoietic cord blood CD34+/CD133+ cells. *Eur J Haematol*, 70:143-150.
- Post MJ, Laham R, Selke FW, Simons M. 2001. Therapeutic angiogenesis in cardiology using protein formulations. *Cardiovascular Research*, 49 (3):522-531.
- Powell TM, Paul JD, Hill JM, Thompson M, Benjamin M, Rodrigo M, McCoy JP, Read EJ, Khuu HM, Leitmann SF, Finkel T, Cannon RO, III. 2005. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25:296-301.
- Pozner CN, Levine M, Zane R. 2005. The cardiovascular effect of cocaine. *J Emergency Med*, 29 (2):173-178.
- Rafii S. 2000. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest*, 105 (1):17-19.
- Rafii S, Heissig B, Hattori K. 2002. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Therapy*, 9:631-641.
- Randolph GJS, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. 1998. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science*, 282:480-483.
- Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Bailey KR, Burnett JC. 2002. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. *J Am Coll Cardiol*, 40 (5):976-982.
- Rehmann J, Li J, Orschell CM, March KL. 2003. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 107:1164-1169.
- Reid CD, Stackpoole A, Meager A, Tikerpae J. 1992. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. *J Immunol*, 149 (8):2681-2688.

## 9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Robinson SN, Seina SM, Gohr JC, Sharp JG. 2005. Hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin in the absence of matrix metalloproteinase-9. *Stem Cells And Development*, 14:317-328.
- Roose SP. 2000. Considerations for the use of antidepressants in patients with cardiovascular disease. *Am Heart J*, 140 (4):S84-S88.
- Roose SP, Miyazaki M. 2005. Pharmacologic treatment of depression in patients with heart disease. *Psychosom Med*, 67 (1):S54-S57.
- Sabin FR. 1920. Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscles as seen in the living blastoderm of the chick during the second day of incubation. *Contributions to Embryology*, 9:213-262.
- Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Rafii S. 2003. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood*, 101:168-172.
- Salvucci O, Yao L, Villalba S, Sajewicz A, Pittaluga S, Tosato G. 2002. Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood*, 99:2703-2711.
- Sandri M, Adams V, Gielen S, Linke A, Lenk K, Kränkel N, Lenz D, Erbs S, Scheinert D, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R. 2005. Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes. *Circulation*, 111:3391-3399.
- Sang HL, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jameson SW, Thistlethwaite PA. 2000. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med*, 342:626-633.
- Sato T, Laver JH, Ogawa M. 1999. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood*, 94:2548-2554.
- Schächinger V. 2006. Reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodeling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI-) Studie. Pressemitteilung der Deutschen Gesellschaft für Herz- und Kreislaufforschung eV, Presstext DGK:04/2006.
- Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. 2006. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 355:1210-1221.
- Schaefer A, Meyer GP, Fuchs M, Klein G, Kaplan M, Wollert KC, Drexler H. 2006. Impact of intracoronary bone marrow cell transfer on diastolic function in patients after acute myocardial infarction: results from the BOOST trial. *Eur Heart J*, 27:929-935.
- Schatteman G. 2005. Are circulating CD133+ cells biomarkers of vascular disease? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25:270-271.
- Scheubel RJ, Zorn H, Silber RE, Kuss O, Morawietz H, Holtz J, Simm A. 2003. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol*, 42 (12):2073-2080.
- Schmeisser A, Strasser RH. 2002. Phenotypic overlap between hematopoietic cells with suggested angioblastic potential and vascular endothelial cells. *J Hematother Stem Cell Res*, 11 (69):69-79.
- Schmeisser A, Garlischs CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser RH, Daniel WG. 2001. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovascular Research*, 49 (671-680)
- Schmidt MM, Guan K, Wobus AM. 2001. Lithium influences differentiation and tissue-specific gene expression of mouse embryonic stem (ES) cells in vitro. *Int J Dev Biol*, 45:421-429.

## 9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Schunkert H. 2003. Prävalenz der chronischen Herzinsuffizienz: neueste Daten zur Epidemiologie. Pressemitteilung der Deutschen Gesellschaft für Herz- und Kreislaufforschung eV, Presstext DGK:04/2003.
- Schuster MD, Kocher AA, Seki T, Martens TP, Xiang G, Homma S, Itescu S. 2004. Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287:H525-H532.
- Scottish Intercollegiate Guidelines Network 2007. 08.05.2007. Management of chronic heart failure: A national clinical guideline [Internet]. [www.sign.ac.uk](http://www.sign.ac.uk).
- Senni M, Tribouilloy CM, Rodeheffer RJ, Evans JM, Jacobsen SJ, Bailey KR, Redfield MM. 1998. Congestive heart failure in the community: A study of all incident cases in Olmsted County, Minnesota, in 1991. *Circulation*, 98:2282-2289.
- Senni M, Tribouilloy CM, Rodeheffer RJ, Evans JM, Jacobsen SJ, Bailey KR, Redfield MM. 1999. Congestive heart failure in the community: Changes in incidence and survival over a 10-year period. *J Am Coll Cardiol*, 1183-73:445A.
- Serke S, Huhn D. 1996. Expression of class I, II, and III epitopes of the CD34 antigen by normal and leukemic hemopoietic cells. *Cytometry*, 26:154-160.
- Shaffer RG, Greene S, Arshi A, Supple G, Bantly A, Moore JS, Mohler ER. 2006. Flow cytometry measurement of circulating endothelial cells: the effect of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations. *Cytometry*, 70B:56-62.
- Shi Q, Rafii S, Wu MHD, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MAS, Storb RF, Hammond WP. 1998. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 92 (2):362-367.
- Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki KI, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. 2001. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 103:2776-2779.
- Sonnenblick M, Rosin A. 1991. Cardiotoxicity of interferon. A review of 44 cases. *Chest*, 99:557-561.
- Stainback RF. 1999. Congestive heart failure arising from diastolic dysfunction in the presence of normal left-ventricular systolic function. *Texas Heart Inst J*, 26 (1):34-41.
- Statistisches Bundesamt Deutschland 2007. 07.05.2007. Aus dem Krankenhaus entlassene vollstationäre Patienten: 20 häufigste Diagnosen [Internet]. <http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab11.php>.
- Steen R, Tjonnfjord GE, Gaudernack G, Brinch L, Egeland T. 1996. Differences in the distribution of CD34 epitopes on normal haemopoietic progenitor cells and leukaemic blast cells. *Brit J Haematol*, 94:597-605.
- Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, Penka M, Wolzt M, Huber K, Wojta J, Minar E, Kopp CW. 2005. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 181:305-310.
- Störk S, Angermann CE. 2007. Das Interdisziplinäre Netzwerk Herzinsuffizienz Würzburg: Universität Würzburg.
- Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, Sorg RV, Kögler G, Wernet P, Müller HW, Köstering M. 2005. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: The IACT Study. *J Am Coll Cardiol*, 46:1651-1658.
- Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Böhm M, Nickenig G. 2003. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*, 107:3059-3065.

## 9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Stroncek DF, Clay ME, Herr G, Smith J, Jaszcz WB, Ilstrup S, McCullough J. 1997. The kinetics of G-CSF mobilization of CD34+ cells in healthy people. *Transfus Med*, 7:19-24.
- Sutherland DR, Marsh JC, Davidson J, Baker MA, Keating A, Mellors A. 1992. Differential sensitivity of CD34 epitopes to cleavage by *pasteurella haemolytica* glycoprotease: implications for purification of CD34-positive progenitor cells. *Exp Hematol*, 20 (5):590-599.
- Tabbibizar R, Maisel AS. 2002. The impact of B-type natriuretic peptide levels on the diagnoses and management of congestive heart failure. *Curr Opin Cardiol*, 17:340-345.
- Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. 1999. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Medicine*, 5 (4):434-438.
- Takano H, Qin Y, Hasegawa H, Ueda K, Niitsuma Y, Ohtsuka M, Komuro I. 2006. Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after myocardial infarction. *J Mol Med*, 84 (3):185-193.
- Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. 1993. Therapeutic angiogenesis: A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*, 93:662-670.
- Tan Y, Shao H, Eton D, Yang Z, Alonso-Diaz L, Zhang H, Schulick A, Livingstone AS, Yu H. 2007. Stromal cell-derived factor-1 enhances pro-angiogenic effect of granulocyte-colony stimulating factor. *Cardiovascular Research*, 73:823-832.
- Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. 2002. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*, 106:2781-2786.
- Tse HF, Thambar S, Kwong YL, Rowlings P, Bellamy G, McCrohon J, Thomas P, Bastian B, Chan JKF, Lo G, Ho CL, Chan WS, Kwong RY, Parker A, Hauser TH, Chan J, Fong DYT, Lau CP. 2007. Prospective randomized trial of direct endomyocardial implantation of bone marrow cells for treatment of severe coronary artery disease (PROTECT-CAD trial). *Eur Heart J*, doi:10.1093 (advance access published online on Nov. 5, 2007):ehm485v481.
- Tsutsui T, Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, Ohnishi M, Kinoshita M. 2002. Plasma oxidized low-density lipoprotein as a prognostic predictor in patients with chronic congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 39 (6):957-962.
- Tura O, Barclay GR, Roddie H, Davies J, Turner ML. 2007. Absence of a relationship between immunophenotypic and colony enumeration analysis of endothelial progenitor cells in clinical haematopoietic cell sources. *J Transpl Med*, 5:37.
- Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weisman IL. 2000. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (26):14720-14725.
- Umeda K, Heike T, Yoshimoto M, Shiota M, Suemori H, Luo HY, Chui DHK, Torii R, Shibuya M, Nakatsuji N, Nakahata T. 2006. Identification and characterization of hemangiogenic progenitors during cynomolgus monkey embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells*, 24 (5):1348-1358.
- Urbich C, Dimmeler S. 2004. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circulation*, 95:343-353.



## 9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. 2003. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation*, 108:2511-2516.
- Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castoldi G, Ferrari R. 2004. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation*, 110:1209-1212.
- van Royen N, Hoefer I, Buschmann I, Kostin S, Voskuil M, Bode C, Schaper W, Piek JJ. 2003. Effects of local MCP-1 protein therapy on the development of the collateral circulation and atherosclerosis in Watanabe hyperlipidemic rabbits. *Cardiovascular Research*, 57:178-185.
- van Royen N, Schirmer SH, Atasever B, Behrens CYH, Ubbink D, Buschmann EE, Voskuil M, Bot P, Hoefer I, Schlingemann RO, Biemond BJ, Tijssen JG, Bode C, Schaper W, Oskam J, Legemate DA, Piek JJ, Buschmann I. 2005. START Trial: A pilot study on stimulation of arteriogenesis using subcutaneous application of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor as a new treatment for peripheral vascular disease. *Circulation*, 112:1040-1046.
- Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. 2001a. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*, 103:2885-2890.
- Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. 2001b. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlated with risk factors for coronary artery disease. *Circulation Research*, 89:e1-e7.
- Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Evans JC, Reiss CK, Levy D. 1999. Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction. *J Am Coll Cardiol*, 33 (7):1948-1955.
- Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmitko PE, Zucco L, Wang CH, Badiwala MV, Mickle DAG, Weisel RD, Fedak PWM, Stewart DJ, Kutryk MJB. 2004. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation*, 109 (17):2058-.
- Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. 1984. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol*, 99:2034-2040.
- Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. 2002. Statin therapy accelerates reendothelialization. A novel effect involving mobilization and incorporation of bone-marrow endothelial progenitor cells. *Circulation*, 105:3017-3024.
- Walter DH, Haendeler J, Reinhold J, Rochwalsky U, Seeger F, Honold J, Hoffmann J, Urbich C, Lehmann R, Arenzana-Seisdesdos F, Aicher A, Heeschen C, Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. 2005. Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circulation Research*, 97:1142-1151.
- Weber M, Hamm C. 2006. Role of B-type natriuretic peptide (BNP) and NT-proBNP in clinical routine. *Heart*, 92:843-849.
- Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB. 1997. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:12425-12430.

## 9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. 2002. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation*, 105:739-745.
- Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G. 2002. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22 (1567-1572)
- Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. 2005. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*, 353:999-1007.
- Werner N, Nickenig G. 2006. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26:1-10.
- Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. 1998. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*, 97:1837-1847.
- Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, Majka M, Kucia M, Maslankiewicz K, Wyderka R, Ochala A, Ratajczak MZ. 2004. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 110:3213-3220.
- Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. 2004. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*, 364:141-148.
- Wu Y, Ip JE, Huang J, Zhang L, Matsushita K, Liew CC, Pratt RE, Dzau VJ. 2006. Essential Role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium. *Circulation Research*, 99:315-322.
- Xiao M, Oppenlander BK, Dooley DC. 2001. Transforming growth factor-beta(1) induces apoptosis in CD34(+)CD38(-/low) cells that express Bcl-2 at a low level. *Exp Hematol*, 29 (9):1098-1108.
- Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. 1993. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial precursors. *Development*, 118:489-498.
- Yamamoto K, Kondo T, Suzuki S, Izawa H, Kobayashi M, Emi N, Komori K, Naoe T, Takamatsu J, Murohara T. 2004. Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24:e192-e196.
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 90 (12):5002-5012.
- Zohlnhöfer D, Ott I, Mehilli J, Schörning K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschläger G, von Wedel J, Bollwein H, Seyfarth M, Dirschinger J, Schmitt C, Schwaiger M, Kastrati A, Schörning A. 2006. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction. *JAMA*, 295:1003-1010.

## **10. Anhang**

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Prof. Dr. med. habil. Dagmar Barz, Herr Dr. rer. nat. Hansjörg Thude, Frau Dr. med. Bettina Brenke und Herr Dr. med. Christian Ehrhardt,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

---

Ort, Datum und Unterschrift: Franziska Lorenz

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben:**

Name: Franziska Lorenz  
Geburtstag: 16. Juli 1983  
Geburtsort: 99706 Sondershausen, Deutschland  
Nationalität: deutsch

### **Schulausbildung:**

09/1990 – 08/1994 Grundschule „Östertal“ in Sondershausen  
09/1994 – 06/2002 Staatliches Gymnasium „Geschwister Scholl“ in Sondershausen  
06/2002 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

### **Hochschulausbildung:**

10/2002 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
08/2004 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum)  
04/2009 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### **Famulaturen und Praktika:**

07/2002 Krankenpflegepraktikum: Unfallchirurgie  
Kyffhäuserkreiskrankenhaus in Sondershausen, Deutschland  
08/2005 Famulatur: Notaufnahme  
US Army Hospital in Würzburg, Bayern, Deutschland  
09/2005 Famulatur: Herz-, Thorax- und Gefäß-Chirurgie  
Universitätsklinikum in Jena, Thüringen, Deutschland  
08/2006 Famulatur: Innere Medizin  
Dumfries & Galloway Royal Infirmary in Dumfries, Schottland, UK  
09/2006 Famulatur: Nephrologie  
Mount Sinai Hospital in NYC, New York, USA  
03/2007 Praktikum Innere Medizin, Pädiatrie und Gynäkologie/Geburtshilfe  
Hospital Obispo Polanco in Teruel, Aragón, Spanien

## 10. Anhang

### Praktisches Jahr:

1. Tertial 08/2007 Wahlfach: Gynäkologie & Geburtshilfe

Universitätsfrauenklinik in Jena, Thüringen, Deutschland

2. Tertial 12/2007 Innere Medizin: Kardiologie, Diabetologie und allgemeine Innere

UniversitätsSpital in Zürich, Kanton Zürich, Schweiz

3. Tertial 04/2008 Chirurgie: 1. Teil: Unfallchirurgie

Helios Klinikum in Erfurt, Thüringen, Deutschland

2. Teil: Allgemeinchirurgie

Greenslopes Private Hospital in Brisbane, Queensland, Australien

### Publikationen:

Fritzenwanger M, Lorenz F, Jung C, Fabris M, Thude H, Barz D, Figulla HR: Differential number of CD34+, CD133+ and CD34+/CD133+ cells in peripheral blood of patients with congestive heart failure. European Journal of Medical Research (2009) 14: 113-117.

---

Ort, Datum und Unterschrift: Franziska Lorenz

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. habil. Dagmar Barz (Direktorin des Instituts für Transfusionsmedizin) für die Überlassung des Themas, Ihren wissenschaftlichen Beistand und ihre Hilfestellung beim formalen Feinschliff dieser Arbeit sowie für die freundschaftliche und äußerst motivierende Betreuung während der gesamten Zeit.

Herrn Dr. rer. nat. Hansjörg Thude (wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Transfusionsmedizin) danke ich besonders für die Einarbeitung an den mir zur Verfügung gestellten Arbeitsmaterialien, die intensive theoretische und experimentelle Betreuung sowie für die kritische Durchsicht der Arbeit und die konstruktiven Anregungen.

Des Weiteren danke ich:

Frau Dr. med. Christel Kummer und Frau Karla Lauer von der Blutbank des Instituts für Transfusionsmedizin sowie allen Mitarbeitern des HLA-Labors, der Blutbank und der Klinischen Chemie und Laboratoriumsdiagnostik in Jena für die gute Zusammenarbeit,

Frau Dr. med. Bettina Brenke, Herrn Dr. med. Michael Fritzenwanger und Herrn Dr. med. Christian Ehrhardt aus der Klinik für Innere Medizin I, Abteilung Kardiologie, für die Unterstützung bei der Beschaffung der Blutproben und die Beratung in klinischen Fragestellungen,

Herrn Dr. Rüdiger Vollandt für die freundliche Unterstützung bei der Einarbeitung in die Grundlagen des SPSS,

Sina Weißenborn für den ständigen Ansporn und die Motivation während der gesamten Zeit

und natürlich danke ich ganz besonders meiner lieben Familie, die mir den Ehrgeiz und die Zielstrebigkeit mit auf den Weg gab und dennoch genug Gelassenheit und Ruhe. Danke für Eure Unterstützung die ganze Zeit über: meine Eltern Dietmar Lorenz und Edeltraud Lorenz, geb. Scholz, mein Bruder und guter Freund Stefan Lorenz und meine Großeltern Else Scholz, Josef und Hildegard (†) Lorenz.